

Nahfeldoptische Untersuchungen an biologischen Systemen im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Physik
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Alexander Kelch

aus Reinbek

Hamburg

2000

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1997 bis Juli 2000 unter der Leitung von Prof. Dr. R. Wiesendanger vom Institut für Angewandte Physik der Universität Hamburg in Kooperation mit der Firma Beiersdorf AG in der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG durchgeführt.

Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. R. Wiesendanger
Prof. Dr. R. Anton

Gutachter der Disputation:

Prof. Dr. R. Wiesendanger
Dr. R. Wepf

Datum der Disputation: 22.9.2000

**Dekan des Fachbereichs Physik und Vorsitzender des
Promotionsausschusses: Prof. Dr. F.-W. Büßer**

Kurzzusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendbarkeit der nahfeldoptischen Mikroskopie (NFOM) im Hinblick auf Penetrationsstudien lichtabsorbierender oder fluoreszierender Substanzen in Haut und Haaren aufzuzeigen. Für diesen Zweck wurde ein kommerzielles NFOM so weit umgerüstet, daß Messungen im UV-Wellenlängenbereich durchgeführt werden konnten. Zusätzlich wurde das System für simultane Messungen des Transmissions- und des Fluoreszenzsignals erweitert.

Es konnten UV-Absorber anhand ihrer Absorption bei 300nm oder 350nm mit dem NFOM auf Glasträgern abgebildet und lokalisiert werden. Für die Penetrationsstudie an Haut wurde unbehandelte und behandelte Haut chemisch fixiert, in Ethanol dehydriert und in Eponharz eingebettet. 200nm Dünnschnitte der Hautproben wurden mit dem NFOM untersucht. UV-Absorber konnten in den Dünnschnitten nicht eindeutig lokalisiert werden, da die Variationen im Transmissionssignal zu stark waren. Die Ursache für diese Variationen liegt in dem Auftreten unterschiedlicher Einflüsse auf das optische Bild, wie Schichtdickenänderungen, Streuung und Oberflächenprofil.

Mit Hilfe der Immunmarkierung von Hautdünnschnitten konnte die Verteilung des Cytokeratins10 in der Epidermis der Haut mit dem NFOM im Fluoreszenzmodus gezeigt werden. Diese Art der Hautpräparation erlaubt das Lokalisieren von Proteinen und Lipiden mit höherer lateraler Auflösung als die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie. Außerdem eröffnet sich hiermit grundsätzlich die Möglichkeit, penetrierende Substanzen im Hautinneren hochauflösend zu lokalisieren, falls sich die zu untersuchende Substanz durch Antikörper markieren läßt.

Das hohe Potential der NFOM konnte weiterhin an Dünnschnitten humaner Haare, welche zuvor mit einem Fluoresceinderivat eingefärbt wurden, demonstriert werden. Die Ergebnisse zeigten die Verteilung des Fluorophors mit einer lateralen Auflösung von ca. 130nm, welche die klassische Lichtmikroskopie nicht erreichen kann. Die NFOM-Bilder wiesen dabei einen nahezu identischen Kontrast wie die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie auf. Topographische Einflüsse der Probe auf das Fluoreszenzsignal sind im Fluoreszenzmodus offenbar unerheblich. Deshalb bietet die Nahfeldoptik eine Alternative zur klassischen Lichtmikroskopie für Penetrationsstudien fluoreszenzmarkierter oder fluoreszierender Substanzen.

Ein großer Vorteil der NFOM besteht darin, daß die Topographie, Transmission und Fluoreszenz an einem Areal einer Probe gleichzeitig gemessen werden kann. Um diese vielfältigen Informationen zu erlangen, bedarf es ansonsten mehrerer Mikroskopietechniken, wie Elektronenmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie oder konfokale Laser- Rastermikroskopie.

Abstract

The aim of the present work was to demonstrate the capability and feasibility of scanning near-field optical microscopy (SNOM) to study the penetration of UV-light absorbing or fluorescent molecules into human skin and hair fibres. For this purpose a commercial SNOM was modified, in order to operate in the UV wavelength range in transmission mode. In addition, the system was expanded for a simultaneous detection of fluorescence and transmission signals.

UV-absorbers were imaged and localized on glass slides due to their specific absorption at 300nm or 350nm. For the penetration study human skin was chemically fixed, dehydrated in ethanol, and embedded in epon resin. 200nm thin sections of treated and untreated skin were investigated by SNOM. In such thin sections UV-absorber molecules could not be unequivocally identified and localized because of strong variations in the transmission signal. The signal variations are caused by other effects such as thickness variations, scattering, and surface profile dependent influences in SNOM transmission mode.

Immuno labeled thin sections of human skin against cytokeratin10 investigated by SNOM in fluorescence mode revealed distinct and very sharp images of the cytokeratin10 distribution in human epidermis. On the one side this allows to localize proteins and lipids more precisely than confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging and on the other side this technique offers an additional way to investigate penetrating molecules if antibodies exist to the substance of interest.

The high potential of SNOM was also demonstrated on thin sections of fluorophor stained human hair fibres. The results showed the distribution of the dye inside the hair with a resolution of about 130nm. This resolution is higher than classical light microscopy can ever achieve. SNOM images in fluorescence mode showed identical contrast and signal variations as in CLSM and hence no topographical nor scattering effects seems to disturb the fluorescence signal. Therefore, SNOM is an alternative to classical methods for a penetration study of fluorophors or fluorescent labeled substances.

A great advantage of SNOM imaging is the possibility to image simultaneously topography, transmission, and fluorescence of the same sample area, whereas to generate these various informations from one specimen with other techniques different microscopes such as electronmicroscopes, atomic force microscopes, or confocal laser scanning microscopes are necessary.

Inhaltsverzeichnis

1	ENLEITUNG	1
2	ZIELSETZUNG	3
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
3.1	GRUNDLAGEN DER LICHTM IKROSKOPIE	4
3.1.1	<i>Klassische Lichtmikroskopie</i>	4
3.1.2	<i>Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie</i>	5
3.2	GRUNDLAGEN DER RASTERSONDENM IKROSKOPIE	6
3.2.1	<i>Rasterkraftmikroskopie</i>	7
3.2.2	<i>Nahfeldoptische Mikroskopie</i>	9
3.2.3	<i>NFOM in Transmissionsstellung</i>	11
3.2.4	<i>Shearforce Mode</i>	12
3.2.5	<i>Sonden</i>	13
3.2.6	<i>Auflösung in der Nahfeldoptik</i>	15
3.2.7	<i>Kontrastentstehung</i>	15
3.3	HAUT	16
3.3.1	<i>Aufbau der Haut</i>	16
3.3.2	<i>Die Penetrationsbarriere der Haut</i>	18
3.3.3	<i>Wechselwirkung mit Licht</i>	19
3.3.4	<i>UV-Filter</i>	19
3.4	HAARE	20
3.4.1	<i>Allgemeines</i>	20
3.4.2	<i>Chemische Zusammensetzung</i>	22
3.4.3	<i>Haarmorphologie</i>	22
3.4.4	<i>Betrachtungen zur Diffusion in das Haarinnere</i>	25
4	MATERIAL UND METHODEN	27
4.1	AUFBAU DES NAHFELDOPTISCHEN MIKROSKOPS	27
4.2	ERGÄNZENDE METHODEN	34
4.2.1	<i>Rasterkraftmikroskopie</i>	34
4.2.2	<i>Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie</i>	34
4.3	PROBENPRÄPARATION	35
4.3.1	<i>UV-Filter</i>	35
4.3.2	<i>Applikation eines UV-Filter auf Haut</i>	36
4.3.3	<i>Fixierung von Haut</i>	36
4.3.4	<i>Präparation dünner Schnitte (Ultramikrotomie)</i>	37
4.3.5	<i>Immunklavierung von Hautdünnschnitten</i>	38
4.3.6	<i>Penetration eines Fluoreszenzderivates in ein Haar</i>	39
5	ERGEBNISSE	40
5.1	VERBESSERUNG DES MIKROSKOPS UND TESTMESSUNGEN	40
5.1.1	<i>Transmission optischer Komponenten des Mikroskops im UV-Bereich</i>	40
5.1.2	<i>Testmessung an Aluminiumstrukturen</i>	42
5.1.3	<i>Testmessung an Titandioxidpartikeln</i>	42
5.1.4	<i>Sensitivität des Systems bei Fluoreszenzmessungen</i>	44
5.2	MESSUNGEN AN UV-FILTERN	45
5.2.1	<i>Absorption und Nachweisempfindlichkeit eines UVA-Filter</i>	46
5.2.2	<i>Lichtfilter in Epon eingebettet</i>	49
5.3	HAUTDÜNNSCHNITTE	52
5.3.1	<i>Humanhaut</i>	52
5.3.2	<i>Immunklavrierte Haut</i>	58
5.4	HAARDÜNNSCHNITTE	60
5.4.1	<i>Melaninpigmente in Haar</i>	60
5.4.2	<i>Penetration eines Fluorophors</i>	65
6	DISKUSSION UND SCHLUßFOLGERUNGEN	70
6.1	APPARATIVE VERBESSERUNGEN UND TESTMESSUNGEN	70

6.1.1	UV-Tauglichkeit des NFOM	70
6.1.2	Fluoreszenzmessungen mit dem NFOM	71
6.2	ABSORPTION UND NACHWEISEMPFÄHIGKEIT EINES UV-FILTERS	72
6.3	FLUORESZENZMESSUNGEN MIT UV-ANREGUNG	74
6.4	UV-FILTER IN EPON	75
6.5	KONTRASTENTSTEHUNG IM NFOM UND ALLGEMEINE INTERPRETATIONEN	76
6.6	HAUTDÜNNNSCHNITTE	79
6.6.1	Humanhaut.....	79
6.6.2	Lokalisation eines UV-Filters in einem Hautdünnnschnitt	80
6.6.3	Immunmarkierte Haut.....	82
6.7	HAARDÜNNNSCHNITTE	83
6.7.1	Melaninpigmente in Haar	83
6.7.2	Penetration eines Fluorophors.....	84
6.8	KONSEQUENZEN FÜR PENETRATIONSSTUDIEN MIT DEM NFOM	86
6.8.1	Transmission	86
6.8.2	Fluoreszenz	87
7	ZUSAMMENFASSUNG	88
8	SUMMARY	90
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	92
10	LITERATURVERZEICHNIS	95

1 Einleitung

Die Rastersondenmikroskopie hat in vielen Bereichen der Wissenschaft und Industrie in den letzten 15 Jahren Einzug erhalten. Mit der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops (STM¹) 1982 von Binnig, Rohrer, Gerber und Weibel [Binnig, 1982] wurde erstmals eine Methode erschaffen, die Strukturen auf atomarer Skala direkt abbilden kann. Die Entwicklung abgewandelter Mikroskopiertechniken ließ nicht lange auf sich warten. So wurde 1986 das Rasterkraftmikroskop (RKM, AFM²) ebenfalls von Binnig vorgestellt, bei welchem die mechanische Auslenkung einer an einem Federarm befindlichen feinen Spitze gemessen wurde, die durch die Wechselwirkung mit der Probenoberfläche hervorgerufen wird [Binnig, 1986]. Diese Technik ermöglicht das Abbilden nicht leitender Probenoberflächen mit ähnlich hohen lateralen Auflösungen, die das STM erreichen kann.

Die Rastersondenmethoden stellen abbildende Techniken dar, bei denen eine Wechselwirkung zwischen Probenoberfläche und einer möglichst kleinen Sonde zur Oberflächenabbildung ausgenutzt wird. Magnetische Kräfte, elektrostatische Kräfte, Reibungskräfte oder auch die Wechselwirkung mit Licht sind Beispiele hierfür.

Die Lichtmikroskopie ist sicherlich die weit verbreitetste Mikroskopieart. Dies liegt unter anderem daran, daß sie eine nicht invasive Abbildung ermöglicht. Der Nachteil der Lichtmikroskopie besteht in der beugungsbedingten Auflösungsgrenze. Diese Grenze verhindert eine orts aufgelöste Abbildung von Strukturen, die sehr viel kleiner als die verwendete Wellenlänge des Lichtes sind.

Die Abhängigkeit der lateralen Auflösung von der Wellenlänge stellt eine unüberwindliche Grenze für die klassische Lichtmikroskopie dar. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, wurde mit der Entwicklung der Nahfeldoptik entdeckt. Die Idee besteht darin, daß die Probe nur durch eine Lichtquelle beleuchtet wird, die kleiner als die Wellenlänge ist und sich in einem geringen Abstand zur Probe befindet [Syngge, 1928]. Dieses Prinzip wurde Anfang der 80-er Jahre von D.W. Pohl,

¹ STM=Scanning Tunneling Microscope

A. Lewis und U.C. Fischer aufgegriffen, die unabhängig von einander ein derartiges Lichtmikroskop entwickelten [Pohl, 1984][Lewis, 1984][Fischer, 1985]. Unter Verwendung der auf den anderen Gebieten der Rastersondenmikroskopie gemachten Erfahrungen konnten somit nahfeldoptische Mikroskope (NFOM, SNOM³) entwickelt werden, die je nach Sonde laterale Auflösungen von bis zu 20nm lieferten [Dürig, 1986][Betzig, 1991].

Die Möglichkeit, Lichtmikroskopie unterhalb der Auflösungsgrenze zu betreiben, wird insbesondere in der Wissenschaft ausgenutzt, um Kenntnisse auf unterschiedlichsten Gebieten zu erlangen. Als Beispiele für den Einsatz der Nahfeldoptik seien folgende Gebiete genannt: Magnetooptische Speicherung, Zellbiologie, Lithographie, Spektroskopie, ...

Eine weitere Möglichkeit für den Einsatz der NFOM stellt die Untersuchung von biologischen Systemen dar, die hinsichtlich der Penetration einer lichtabsorbierenden oder fluoreszierenden Substanz in ein Gewebe (z.B. Haut) von Interesse sein können, welche mit elektronenmikroskopischen Methoden nicht nachgewiesen werden kann. In der kosmetischen Industrie liegt das Interesse besonders in dem Penetrationsverhalten von Inhaltsstoffen, die in den zahlreichen Pflegeprodukten für Haut und Haare eingesetzt werden. In dieser Arbeit wird genau diese Thematik behandelt. Dabei werden die Möglichkeiten bezüglich einer Penetration fluoreszierender oder wellenlängenspezifisch absorbierender Substanzen in das Haar- oder Hautinnere beleuchtet. Hier können neue Erkenntnisse aufgrund der relativ hohen lateralen Auflösung gegenüber der klassischen Lichtmikroskopie erwartet werden.

Es werden dabei vornehmlich die Möglichkeiten abgeschätzt, UV-Filter in Hautquerschnitten nach Applikation eines Sonnenschutzproduktes zu lokalisieren. Für Produktentwickler von Sonnenschutzprodukten ist es von großer Bedeutung, wie gleichmäßig sich die UV-Filter aus einer Formulierung auf der Haut verteilen, um eine vollständige Hautabdeckung zu gewährleisten. Weiterhin besteht auch ein großes Interesse an der Penetration von UV-Filtern in die Haut, da diese Substanzen oftmals toxikologisch und allergologisch bedenkbar für die tieferen Hautschichten

² AFM=Atomic Force Microscope

sind. Für eine genaue Lokalisation von UV-Filtern kann die Autoradiographie eingesetzt werden, die aber aufgrund der Verwendung radioaktiv markierter Substanzen für in-vivo Penetrationsstudien an Humanhaut nicht zum Einsatz kommen darf [Pflücker, 1998]. Daher stellt die Nahfeldoptik eine Alternative für die Untersuchungen von UV-Filtern nach Applikation an Humanhaut dar, so daß neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet aufgezeigt werden können.

Es gibt nur sehr wenige Publikationen, in denen nahfeldoptische Messungen im UV-Bereich durchgeführt wurden. Bei diesen Arbeiten handelt es sich im wesentlichen um die Herstellung von NFOM-Sonden, die für eine Messung im UV-Bereich geeignet sind. Bei den bekannten Publikationen wurden Fluoreszenzmessungen gezeigt. Es wurden dabei mit 325nm phosphorhaltige Partikel [Nishikawa, 1999] und mit 351nm Polysilane angeregt [Monobe, 1998]. Eine weitere Arbeit befaßte sich mit der Lithographie. Dort wurden Strukturen mit unbedampften UV-Faserspitzen in photoempfindliche Materialien geschrieben [Smollyaninov, 1995]. Es gibt daher kaum Systeme, die für einen Einsatz im UV-Bereich optimiert sind.

NFOM-Untersuchungen im UV-Bereich an UV-Filtern, die in Sonnenschutzprodukten eingesetzt werden, und NFOM-Untersuchungen hinsichtlich der Penetration von Substanzen in das Haarinnere wurden bislang noch nicht veröffentlicht. Die vorliegende Arbeit liefert somit wichtige Zusammenhänge und neue Aufschlüsse bezüglich der Einsatzfähigkeit der Nahfeldoptik in der kosmetischen Industrie.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein kommerzielles NFOM derart umzugestalten, daß Messungen im UV-Bereich bis 300nm und Fluoreszenzmessungen im sichtbaren Bereich möglich sind. Des weiteren sollten Erkenntnisse über die Anwendbarkeit des NFOM hinsichtlich der Penetration fluoreszierender und absorbierender Substanzen in Haut und Haaren gewonnen werden.

³ SNOM=Scanning Near-Field Optical Microscope

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Grundlagen der Lichtmikroskopie

Die klassische Lichtmikroskopie ist eine verbreitete Mikroskopietechnik in der Forschung und Industrie. Dies liegt daran, daß sie relativ einfach in der Handhabung ist, schnell Ergebnisse liefert und zudem noch kostengünstig ist. Außerdem stellt die Lichtmikroskopie eine nicht invasive Methode dar, mit welcher beispielsweise biologische Systeme in ihrem natürlichen Zustand abgebildet werden können. Die klassische Lichtmikroskopie (LM) und die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)⁴ wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um nahfeldoptische Abbildungen mit denen dieser etablierten lichtmikroskopischen Methoden zu vergleichen. In den beiden folgenden Kapiteln wird daher kurz auf die Lichtmikroskopie eingegangen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf das Auflösungsvermögen gelegt.

3.1.1 Klassische Lichtmikroskopie

In der klassischen LM wird das Auflösungsvermögen durch die Beugung des Lichtes an den Strukturen des Objektes und an den Umrandungen der abbildenden Linsen beschränkt. Für inkohärente Bestrahlung des Objektes oder für selbstleuchtende Objekte, wird die Auflösung nur durch die Beugung an den Umrandungen der Objektivlinsen limitiert. Dies gilt auch für die Fluoreszenzmikroskopie, bei der die Probe zum Leuchten angeregt wird. Ein leuchtender Punkt wird daher nicht als Punkt abgebildet, sondern vielmehr die Faltung des Leuchtpunktes mit der Übertragungsfunktion des abbildenden Systems. Die Intensitätsverteilung des resultierenden Beugungsmusters in der Bildebene besteht im wesentlichen aus einem zentralen Maximum und aus hellen Beugungsringen, deren Intensität nach außen hin abfällt (Abb. 1).

Nach dem Rayleigh-Kriterium für das Auflösungsvermögen können zwei selbstleuchtende Punkte nur dann theoretisch aufgelöst werden, wenn das Maximum nullter Ordnung des einen Punktes mit dem ersten Minimum des zweiten Punktes zusammenfällt. Unter Verwendung der Intensitätsverteilung des Beugungsmusters

bedeutet dies, daß der Abstand Δr zweier noch aufzulösender Punkte sich nach folgender Formel ergibt :

$$\Delta r = \frac{0,61\lambda}{n \sin \alpha} \quad (1)$$

Daraus folgt, daß Strukturen um 200nm bei Verwendung sichtbaren Lichtes theoretisch noch aufgelöst werden können. In der Praxis wird das Auflösungsvermögen allerdings durch Linsenfehler und Streuung des Lichtes besonders bei dickeren Proben reduziert. Eine Verbesserung der Auflösung kann hingegen mit einem CLSM erzielt werden [Robenek, 1995]. Auf diese Technik wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

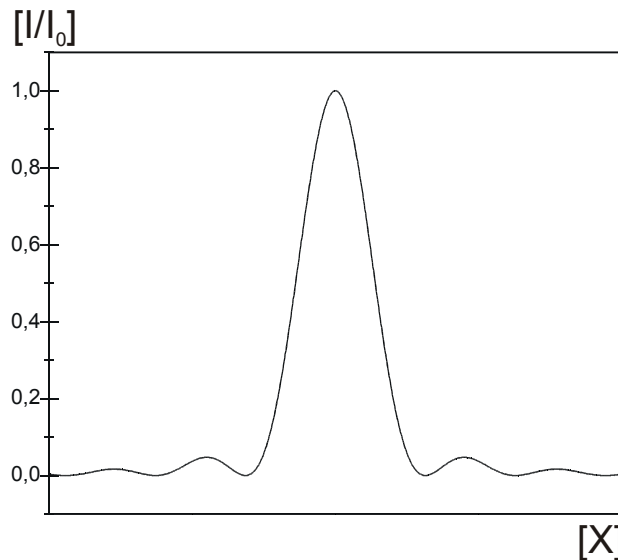


Abb. 1: Beugungsmuster einer Welle, die an einer Lochblende gebeugt wurde. I=Intensität, X=Ortskoordinate.

3.1.2 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie stellt eine Verbesserung der herkömmlichen Lichtmikroskopie dar, weil durch entsprechende Blenden nur das Licht zur Abbildung genutzt wird, welches sich in der Fokusebene befindet. Insbesondere bei dickeren Proben macht sich dies bemerkbar, da eine Verbesserung der Auflösung in Z-Richtung (Senkrecht zur Objektebene) durch die Konfokalität erzeugt wird. Allerdings kann sich auch die laterale Auflösung erhöhen, weil beim CLSM das Fokusvolumen

⁴ CLSM = Confocal Laser Scanning Microscopy

der Anregung und der Detektion des von der Probe ausgehenden Lichtes identisch ist. Dieses führt zu einem Quadrieren der Punktübertragungsfunktion⁵ des optischen Systems und damit letztlich zu einer um den Faktor $\sqrt{2}$ verbesserten lateralen Auflösung [Shotton, 1989].

Mit dieser Art der Lichtmikroskopie können im sichtbaren Wellenlängenbereich laterale Auflösungen von 150nm-200nm in der Praxis erzielt werden, wie Messungen an 5-10nm großen Löchern in einem Goldfilm zeigten [Shotton, 1989].

Aufgrund der komplexen Zusammenhänge in der CLSM würde eine detaillierte Beschreibung dieser Mikroskopie den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Eine genauere Betrachtung und der prinzipielle Aufbau eines CLSM finden sich in [Pawley, 1993].

3.2 Grundlagen der Rastersondenmikroskopie

Die Rastersondenmikroskopie stellt einen Sammelbegriff für diejenigen Mikroskopietechniken dar, bei denen eine Sonde über die Probenoberfläche zeilenförmig bewegt wird, um die Probe anhand verschiedener Eigenschaften abzubilden. Je nach Art der Sonde und deren Wechselwirkung zwischen ihr und der Probenoberfläche werden die einzelnen Mikroskopietechniken benannt. Einen guten Überblick über die verschiedenen Rastersondenmikroskopien liefert [Wiesendanger, 1994]. Die zwei in dieser Arbeit vornehmlich verwendeten Rastersondenmikroskopien, die Rasterkraftmikroskopie (RKM) [Binnig, 1986] und nahfeldoptische Mikroskopie (NFOM) [Pohl, 1984], werden in den beiden nächsten Kapiteln näher erläutert, wobei aufgrund der Thematik dieser Arbeit in erster Linie auf die nahfeldoptische Mikroskopie eingegangen wird.

⁵ Diese Funktion bestimmt die Intensitätsverteilung eines leuchtenden Punktes, welcher durch ein optisches System abgebildet wird.

3.2.1 Rasterkraftmikroskopie

In der RKM wird eine sehr feine Spitze, die sich am Ende eines Federbalkens befindet (Cantilever), zur Abbildung des Oberflächenprofils einer Probe benutzt (siehe Abb. 2). Dabei wird der sogenannte Cantilever in den Kontakt mit der Probe gebracht und mit Hilfe von Piezoelementen zeilenförmig über die Oberfläche bewegt [Binnig, 1986] [Quate, 1994]. Durch die auftretenden Kräfte zwischen Spitze und Probe kommt es zu einer Verbiegung des Cantilevers. Die wichtigsten Kräfte sind dabei :

- Repulsive Pauli-Abstoßung im Kontaktbereich
- Attraktive Van der Waals-Kraft langer Reichweite
- Attraktive Kapillarkräfte (verursacht durch Kontaminationsschichten auf der Oberfläche)

Die verschiedenen Kräfte, die in der Rasterkraftmikroskopie relevant sind, werden in [Meyer, 1992][Ciraci, 1995][Whangbo, 1997] aufgeführt. Die resultierende Verbiegung des Cantilevers kann mit Hilfe eines Lichtzeigersystems so gut detektiert werden, daß Auslenkungen unterhalb eines Ångströms registriert werden können [Wiesendanger, 1994]. Das Lichtzeigersystem besteht aus einem auf die Rückseite des Cantilevers fokussierten Laserstrahl und einer ortsempfindlichen Photodiode. Das von der Rückseite des Cantilevers reflektierte Licht erzeugt in der Photodiode ein Signal. Dieses Signal wird in einen Regelkreis gespeist, der mit Hilfe von Piezoelementen dafür sorgt, daß beim Abrastern der Probe die Verbiegung konstant gehalten wird [Marti, 1995]. Das Spannungssignal für das Z-Piezoelement (Piezoelement senkrecht zur Oberfläche), durch welches der Abstand nachgeregelt werden muß, kann nach Kalibrieren des Piezos direkt in Höhendaten umgerechnet werden. Letztlich wird eine Topographie der Probe dargestellt, welche mit einer Höhenlinienkarte konstanter Kraft gleichzusetzen ist [Fuchs, 1994].

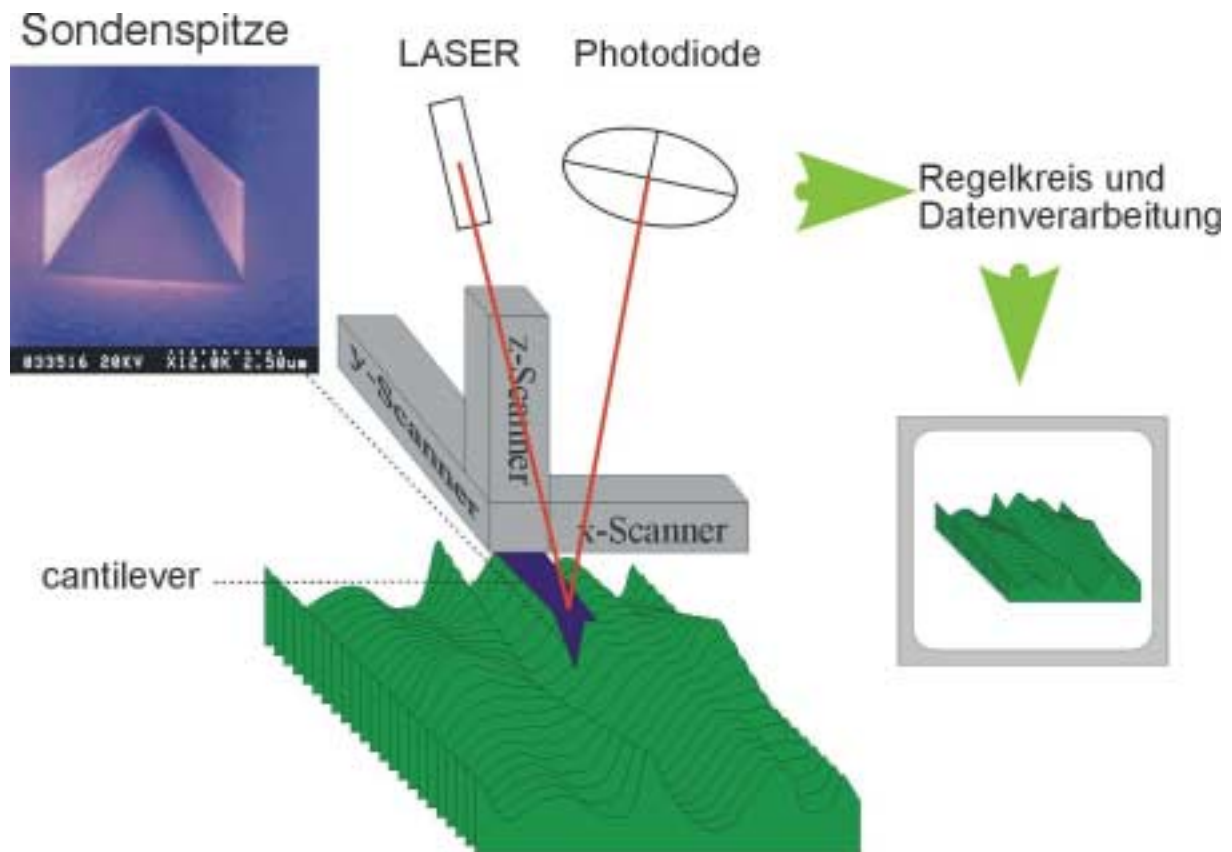


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops.

Im Laufe der Jahre haben sich verschiedene Meßmodi entwickelt, bei denen der Cantilever z.B. zu resonanten Schwingungen angeregt wird (Tapping Mode) [Albrecht, 1991] [Cleveland, 1998]. Ein ebenfalls dynamischer Meßmodus stellt der Pulsed Force Mode dar, bei dem der Cantilever eine sinusförmige Auf- und Abwärtsbewegung beim Abrastern durchführt, ohne zur Resonanz angeregt zu werden [Rosa, 1997]. Diese Betriebsarten werden so eingesetzt, daß die Spitze nur zeitweilig im Kontakt mit der Probe ist. Dadurch wird eine Verringerung der lateral angreifenden Kräfte bewirkt. Folglich können auch weichere und wenig fixierte Proben zerstörungsfrei abgebildet werden [Radmacher, 1992][Herminghaus, 1997]. Mit diesen Betriebsarten ist es zudem möglich, zusätzlich zur Topographie auch Informationen über lokale Materialeigenschaften zu gewinnen [Winkler, 1996] [Rosa, 1997].

Mit dieser Mikroskopie können Abbildungen von Oberflächen erzeugt werden, bei denen Strukturen im Nanometerbereich und bei besonders glatten Oberflächen im atomaren Bereich lateral aufgelöst werden können [Erlandsson, 1996].

3.2.2 Nahfeldoptische Mikroskopie

In der nahfeldoptischen Mikroskopie wird die beugungsbedingte laterale Auflösungsgrenze in der Lichtmikroskopie unterschritten. Dies geschieht durch das Ausnutzen von nahfeldoptischen Effekten, die darauf beruhen, daß in unmittelbarer Nähe einer Lichtquelle ein evaneszentes elektromagnetisches Feld vorherrscht [Pohl, 1984]. So setzt sich zum Beispiel das elektromagnetische Feld eines schwingenden Dipols aus einer mit der Entfernung r stark abfallenden Komponente (Nahfeld) und einem wellenförmig fortschreitenden Anteil (Fernfeld) zusammen, der erst für $r \geq \lambda/2\pi$ überwiegt [Jackson, 1975]. λ beschreibt dabei die Wellenlänge des vom Dipol abgestrahlten Lichtes. Als Lichtquelle, mit der man Proben nahfeldoptisch untersuchen kann, wurde eine kleine Öffnung in einem Metallfilm, der von einer Seite mit Licht bestrahlt wird, von Syngé schon vor ca. 70 Jahren vorgeschlagen [Syngé, 1928]. Besitzt diese Öffnung einen Durchmesser, der kleiner als die Wellenlänge des Lichtes ist, so tritt in unmittelbarer Nähe der Apertur ein evaneszentes Feld auf, welches nicht in den freien Raum propagiert [Dürig, 1986].

Wird die Oberfläche einer Probe in einen Abstand von wenigen Nanometern zur Apertur gebracht, so wird die Transmission des Lichtes in erster Linie von der Wechselwirkung zwischen Nahfeld und Probe beeinflusst. Durch diese Anordnung können laterale Auflösungen im Bereich der Aperturgröße erzielt werden, weil im Nahfeld keine Beugungserscheinungen auftreten [Fischer, 1990][Betzig, 1987].

Der Photonenfluß durch eine derartige Apertur ist extrem abhängig von dem Aperturdurchmesser a und der Wellenlänge λ . Die auf die einfallende Leistung normierte Leistung P_{em} für Abstände $r > \lambda$ berechnet sich für eine derartige Apertur durch :

$$P_{em} = (128 / 27\pi) (2\pi / \lambda)^4 (a/2)^6 \quad (2)$$

[Dürig, 1986].

Daraus ergibt sich, daß durch sehr kleine Aperturen nur wenig Licht hindurchtreten kann. Ein Laserstrahl mit $1\text{mW} / \mu\text{m}^2$ und $\lambda = 500\text{nm}$ würde eine Emission des Lichtes aus einer Apertur mit einem Durchmesser von 100nm hervorrufen, die um

den Faktor $6 \cdot 10^{-4}$ abgeschwächt wäre. Es wurden verschiedene Verfahren entwickelt, Lichtquellen mit geringen Aperturdurchmessern zu konzipieren. Eine der geläufigsten Arten ist das Metallbeschichten von spitzzulaufenden Glasfasern, wodurch Aperturen von bis zu 20nm im Durchmesser an der Faserspitze hergestellt werden können [Betzig,1991]. Die Intensitätsverteilung des emittierten Lichtes derartiger Sonden wird in Kapitel 3.2.5 detaillierter dargestellt.

In Anlehnung an die Rasterkraftmikroskopie wurden erste nahfeldoptische Instrumente von Pohl [Pohl, 1984], Fischer [Fischer, 1985] und Lewis [Lewis, 1984] realisiert. Eine Lichtquelle mit kleiner Apertur wird dabei zeilenförmig unter Konstanthalten des Abstandes über eine Probenoberfläche bewegt und das transmittierte Licht detektiert. Dürig erzielte 1985 mit einem weiterentwickelten Mikroskop, bei dem der Tunnelstrom zwischen Spitze und Probe zur Abstandsregelung ausgenutzt wurde, erstmals eine laterale Auflösung um 20nm [Dürig,1986].

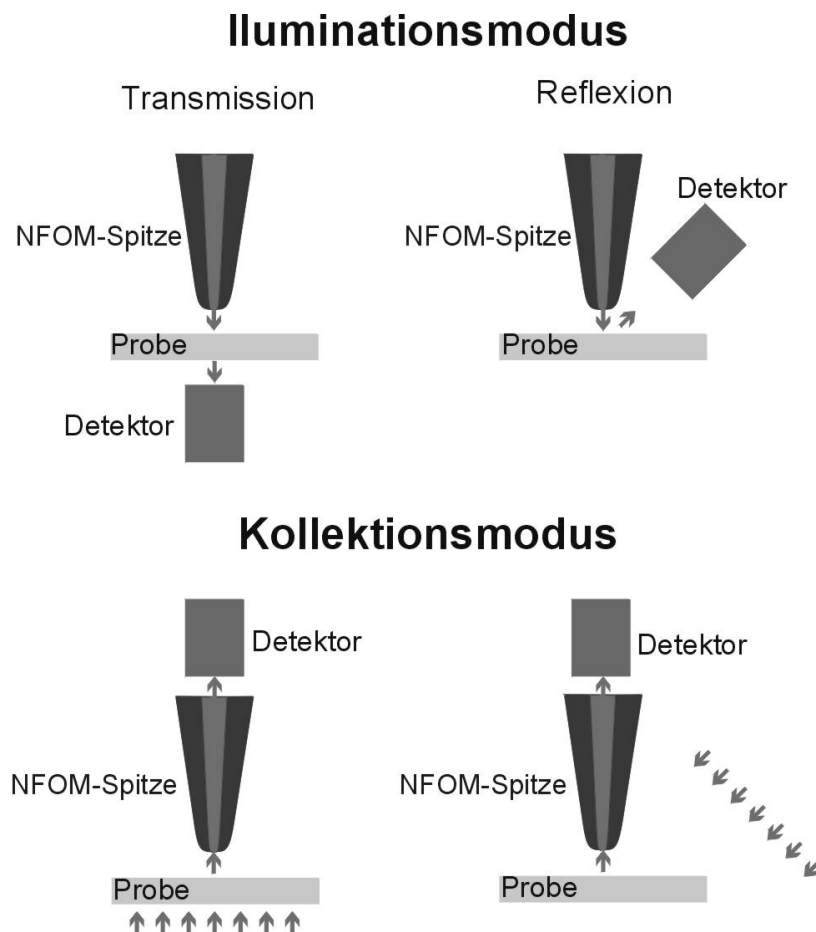


Abb. 3: Meßprinzip der Nahfeldoptik für verschiedene Meßmodi.

Es sind verschiedene Meßanordnungen in der NFOM denkbar, welche in der Praxis je nach Anforderung an das Mikroskop und Probenbeschaffenheit ihren Einsatz finden [Greffet, 1996]. Die unterschiedlichen Anordnungen sind in Abb. 3 illustriert.

3.2.3 NFOM in Transmissionsstellung

In Abb. 4 ist der prinzipielle Aufbau eines NFOM's dargestellt, um das Meßprinzip zu veranschaulichen. Licht eines Lasers wird über eine Fokussierungsoptik in eine Glasfaser eingekoppelt. Dieses gelangt wiederum mit Hilfe eines Faser-Faserkopplers (Fasersplice) in die NFOM-Sonde, welche aus einer spitzzulaufenden Glasfaser besteht, die an der Spitze eine Apertur von ca. 100nm aufweist (siehe Kapitel 3.2.5). Die Faser ist dabei an einer Quarzstimmgabel fixiert, die zu resonanten Schwingungen parallel zur Oberfläche angeregt wird. Das Stromsignal dieser Quarzstimmgabel hängt unmittelbar mit der Oszillationsamplitude zusammen und ändert sich bei Annäherung an die Oberfläche durch Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe (siehe Kapitel 3.2.4).

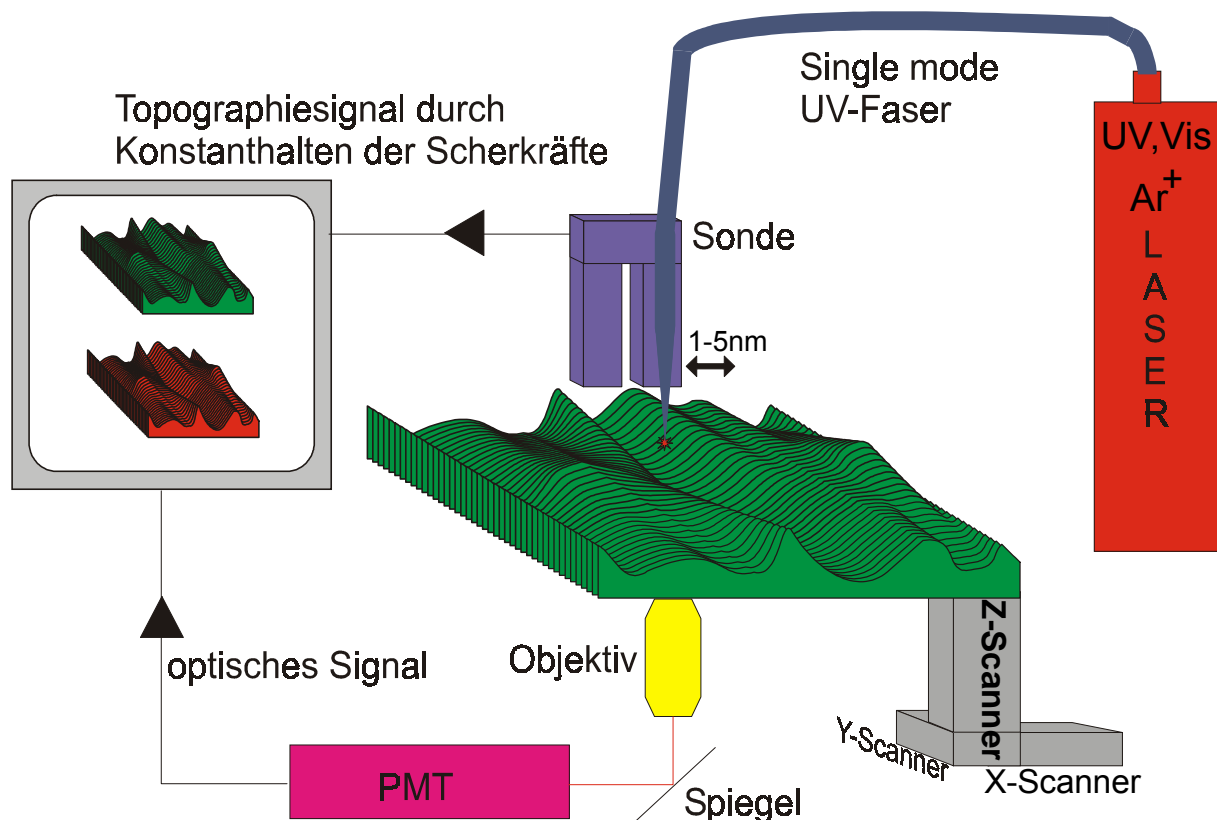


Abb. 4: Schematische Darstellung eines nahfeldoptischen Mikroskops in Transmissionsstellung.

Durch Konstanthalten des Signals kann der Abstand zwischen Apertur und Oberfläche beim zeilenförmigen Abrastern so nachgeregelt werden, daß die Spitze dem Oberflächenprofil folgt. Daraus resultiert letztlich eine topographische Abbildung der Probe ähnlich wie beim AFM. Gleichzeitig wird mit einem Objektiv das Licht, welches durch die Probe gelangt, gesammelt und an jedem Punkt des Rasterbereiches mit einem Photomultiplier detektiert. Dies ergibt eine optische Abbildung der Probe. Bei diesem Aufbau wird nur die Probe bewegt, damit die Spitzenapertur im Fokus des Objektivs bleibt.

3.2.4 Shearforce Mode

Der Abstand zwischen Spitzenapertur und Probenoberfläche wird beim Abrastern der Probe konstantgehalten, weil die Wechselwirkungszone des Lichtes an jedem Meßpunkt idealerweise gleich sein sollte. Ein häufig eingesetztes Verfahren zur Regelung des Abstandes wurde Anfang der 90-er Jahre entwickelt [Betzig, 1992]. So kann mit dem sogenannten „Shearforce Mode“ der Abstand beim Abrastern der Oberfläche konstantgehalten werden. Die Sonde wird dabei zu vertikalen Schwingungen in Resonanz angeregt. Durch die Wechselwirkung der Spitze mit der Probenoberfläche wird die Resonanz verschoben und die Amplitude gedämpft. Dadurch ändert sich die Phasendifferenz zwischen Anregung und Oszillation der Sonde. Die Phasenänderung kann mit Hilfe von Piezoelementen [Brunner, 1997] oder mittels Quarzstimmgabeln detektiert werden [Karrai, 1995]. Das letztere Verfahren wurde in dieser Arbeit verwendet. Wird das spitzzulaufende Faserende an einem Arm einer Quarzstimmgabel fixiert, so wird ein Stromsignal von der Quarzstimmgabel bei resonanter Schwingung erzeugt, welches zur Messung der Phasendifferenz ausgenutzt wird [Karrai, 1995] [Ruiter, 1998]. Die Amplitude der Oszillation liegt typischerweise unterhalb von 1nm beim Abrastern und die auf die Spitze wirkenden Kräfte sind dabei geringer als 1nN [Pedarnig, 1998]. Der Abstand zur Probenoberfläche beträgt bei derartigen Sonden unter 25nm [Karrai, 1995].

Die Art der Wechselwirkung ist dabei noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, daß van der Waals-Kräfte langer Reichweite, Kapillarkräfte [Toledo-Crow, 1992] oder kurzer mechanischer Kontakt die Ursache für die Dämpfung der Oszillation sind [Gregor, 1996]. Möglicherweise sind Aufladungseffekte an der

Oberfläche und der Sondenspitze für das Dämpfen der Spitzenoszillation verantwortlich. Zumindest wurde eine Materialabhängigkeit der Scherkräfte experimentell festgestellt [Durkan, 1996].

3.2.5 Sonden

Das Herzstück eines jeden NFOM's sind die Sonden. Üblicherweise werden spitzzulaufende Glasfasern verwendet, an deren Enden durch Metallbeschichtung eine lichtdurchlässige Öffnung von 20-150nm erzeugt wird. In der Regel wird Aluminium aufgedampft, da es eine geringe Eindringtiefe des Lichtes besitzt und somit den seitlichen Austritt des Lichtes bei Schichtdicken von ca. 100nm verhindert (Abb. 5a) [Betzig, 1991][Valaskovic, 1995].

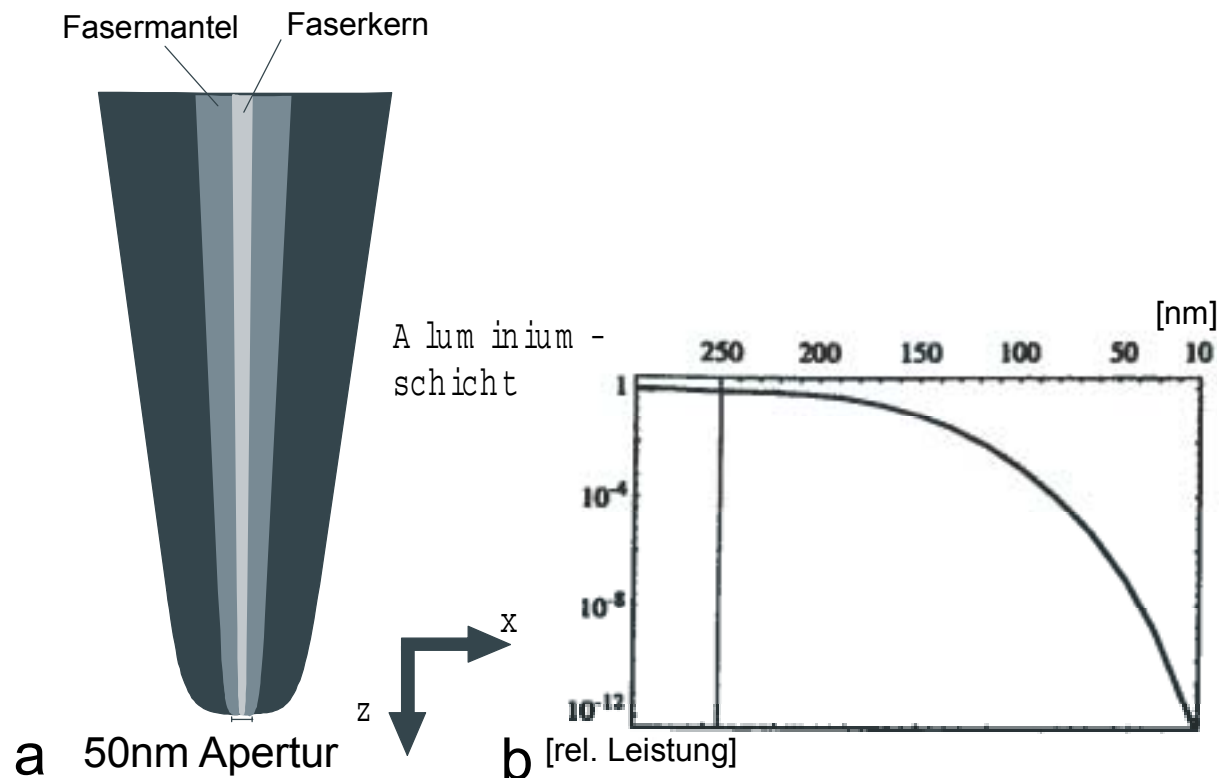


Abb. 5: a) Prinzipieller Aufbau einer NFOM-Sonde bestehend aus einer Lichtleitfaser, die mit Aluminium beschichtet wurde. b) Relative Lichtleistung, die bei derartigen Sonden aus der Apertur gelangt.

Die Intensitätsverteilung des elektromagnetischen Feldes im Bereich der Spitzenapertur ist von komplizierter Natur und wird hier anhand der Abb. 5 und Abb. 6 erläutert. Diese Grafiken liegen dabei einem zweidimensionalen Modell nach Berechnungen von L. Novotny zugrunde [Novotny, 1996]. Mit Hilfe des MMP-

Verfahrens⁶ wurde das elektromagnetische Feld innerhalb und außerhalb der Spitze für eine ebene Welle, die sich im Faserkern ausbreitet, berechnet. Als Aperturdurchmesser wurden 50nm und als Wellenlänge 488nm angenommen. Aufgrund des sich stark zuspitzenden Faserkerns am Sondenende gelangt nur wenig Licht durch die Sondenapertur. Dies liegt daran, daß der Kerndurchmesser kleiner als die Wellenlänge des Lichtes wird. Hierdurch wird ein wellenförmiges Fortschreiten des Lichtes im Faserkern verhindert. Das elektromagnetische Feld fällt stark ab, so daß nur ein geringer Bruchteil der eingekoppelten Leistung zur Spitzenöffnung gelangt. Ein Großteil der Lichtleistung wird dabei von der Aluminiumummantelung reflektiert oder dissipiert in dieser. Bei diesem realitätsnahen Modell wird die Leistung, welche in die Faser einkoppelt, bei einer Apertur von 100nm um den Faktor 10^{-3} abgeschwächt (Abb. 5b) [Novotny, 1994, 1995, 1996].

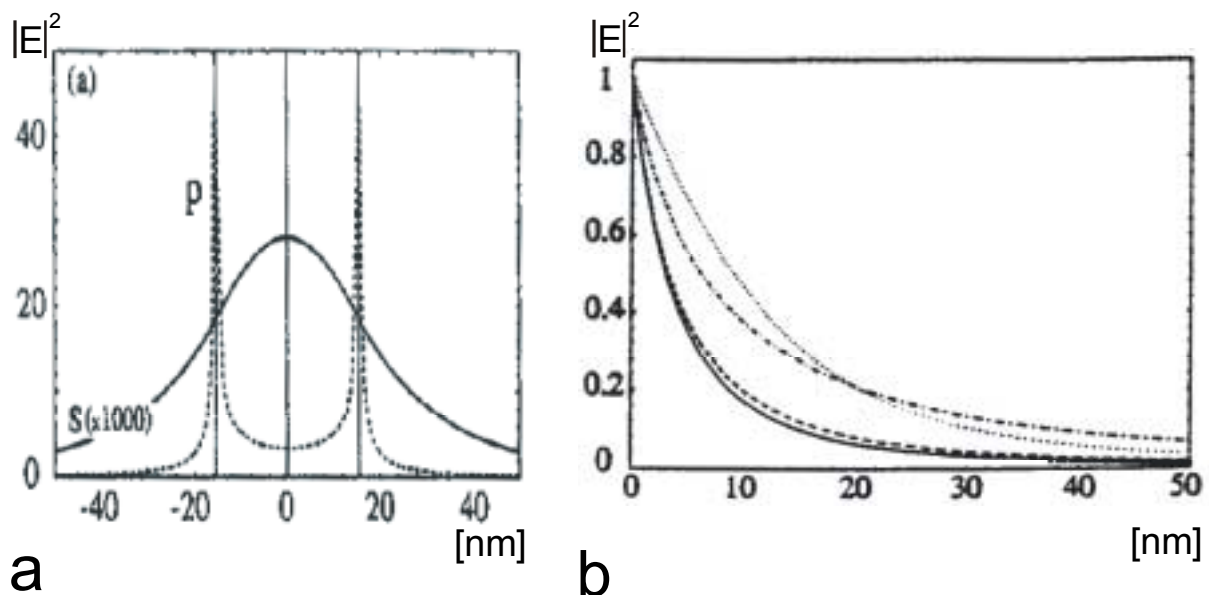


Abb. 6: a) Intensitätsverteilung in xy-Richtung für P- und S-Polarisation. b) Intensitätsverteilung in z-Richtung für verschiedene Aperturdurchmesser aus [Novotny, 1996].

Hinter der Apertur fällt die Intensität in Z-Richtung (parallel zur Faserachse) als auch in der Y-X- Ebene nach nur wenigen Nanometern stark ab, so daß nur in einem geringen Bereich um die Spitzenöffnung eine hohe Lichtintensität vorherrscht. Man spricht hier auch von einem Lichteinschluß (Lightconfinement) im Bereich der Spitzenapertur [Fischer, 1990]. Für die beiden möglichen Polarisierungsebenen des Modells von Novotny ergeben sich dabei unterschiedliche Verläufe in der Intensität.

⁶ Das MMP-Verfahren (Multiple Multipol-Verfahren) ist eine numerische Methode zur Berechnung von elektromagnetischen Feldern.

Bei der P-Polarisation⁷ kommt es an der Aperturbegrenzung zu einer starken Felderhöhung bevor die Intensität nach außen hin abfällt (Abb. 6a). Bei der S-Polarisation liegt dagegen die maximale Intensität im Zentrum der Apertur und fällt von dort stetig ab.

3.2.6 Auflösung in der Nahfeldoptik

Das Auflösungsvermögen in der Nahfeldoptik hängt von der Größe der Apertur und dem Abstand zwischen Lichtquelle und Probe ab, da diese beiden Parameter die Größe des Volumens bestimmen, in welchem die maßgebliche Wechselwirkung des Lichtes mit der Probe stattfindet. Die Aperturgröße kann aufgrund zweier Überlegungen nicht beliebig klein gewählt werden. Zum einen tritt wenig Licht aus der Apertur aus, so daß bei sehr kleineren Aperturen die Detektion des Lichtes technisch gesehen immer schwieriger wird. Zum anderen sind auch Metalle in gewissem Maße lichtdurchlässig. Dies wird durch die Eindringtiefe des Lichtes in das Material bestimmt, welche bei Metallen im Bereich von 10nm liegt. Daher sind laterale Auflösung von höchstens 10nm mit derartigen Sonden zu erwarten [Dürig, 1986].

3.2.7 Kontrastentstehung

Die verschiedenen Möglichkeiten, einen optischen Kontrast der Probe zu messen, sind ähnlich wie in der konventionellen Lichtmikroskopie durch Absorption, Polarisation, Phase, Fluoreszenz und Magnetooptik gegeben [Betzig, 1992][Moers, 1994][Chen, 1999]. Ramanspektroskopie wurde dabei auch schon in der Nahfeldoptik angewendet [Deckert, 1998][Zeisel, 1997].

Da allerdings die Intensität des aus der Apertur tretenden Lichtes von der dielektrischen Funktion und Geometrie des Mediums abhängt, welches sich im Nahfeld der Apertur befindet, besteht das optische Bild aus Einflüssen der Topographie und den optischen Eigenschaften der Probe [Pohl, 1988][Hecht, 1995].

⁷P-Polarisation bedeutet, daß der E-Vektor des elektromagnetischen Feldes parallel zur Bildebene in Abb. 5a liegt)

Ein dielektrisches Medium im Nahfeld der Spitzenapertur erzeugt einen erhöhten Lichtfluß durch die Öffnung der Spitze und somit eine größere Intensität im Nahfeld, weil evaneszente Feldanteile in das Medium einkoppeln können [Novotny, 1996]. Aufgrund des stark in Z-Richtung abfallenden Feldes, ist das transmittierte Licht extrem abhängig von dem Abstand zwischen Spitzenapertur und Probenoberfläche. Trotz Nachregelung des Abstandes, kann es zu topographiebedingten Effekten im Transmissionsbild kommen [Hecht, 1997]. Auf diese Effekte wird in der Präsentation der Ergebnisse und in der Diskussion noch näher eingegangen.

3.3 Haut

3.3.1 Aufbau der Haut

Die Haut besitzt einen schichtartigen Aufbau bestehend aus der Subcutis, Cutis und der Epidermis. Die Epidermis der Haut ist hinsichtlich der Penetration von Substanzen von besonderem Interesse, weil sie als äußerste Schicht den menschlichen Körper von äußeren Einflüssen abschirmt und gleichzeitig eine Barrierefunktion für den Wassertransport von Innen nach Außen übernimmt. Da die unteren Hautschichten für die Untersuchungen dieser Arbeit nicht relevant sind, wird nur auf die Epidermis eingegangen. Die Epidermis läßt sich in weitere Schichten einteilen, die dem jeweiligen Zustand von Hautzellen, den Keratinozyten, während der Differenzierung entsprechen (Abb. 7).

Im Stratum basale werden Keratinozyten durch Zellteilung gebildet, welche langsam nach außen hin wandern und sich dabei einer Differenzierung unterwerfen. In der nächst höheren Zone, dem Stratum spinosum, vergrößert sich das Zellvolumen, eine Erweiterung der Interzellularräume und die Bildung von „Lamellar Bodies“ (LB) setzt ein. Die LB's sind 0,1-0,3µm große lipidhaltige Vesikel mit einer äußeren Membran und einer inneren lamellaren Struktur [Landmann, 1985][Leigh, 1994].

Im Stratum granulosum wird der Inhalt der LB's in den Zellzwischenraum abgegeben (Exozytose). Die Lipide ordnen sich nun zu lamellaren Lipidschichten im Zellzwischenraum an und bilden so eine Matrix für die sich nun verhornenden Keratinozyten [Landmann, 1986]. Das Stratum granulosum zeichnet sich weiterhin

dadurch aus, daß Granula aus Keratohyalin gebildet werden und die Zellen eine abgeflachte Form einnehmen [Landmann, 1985][Bereiter-Hahn, 1986].

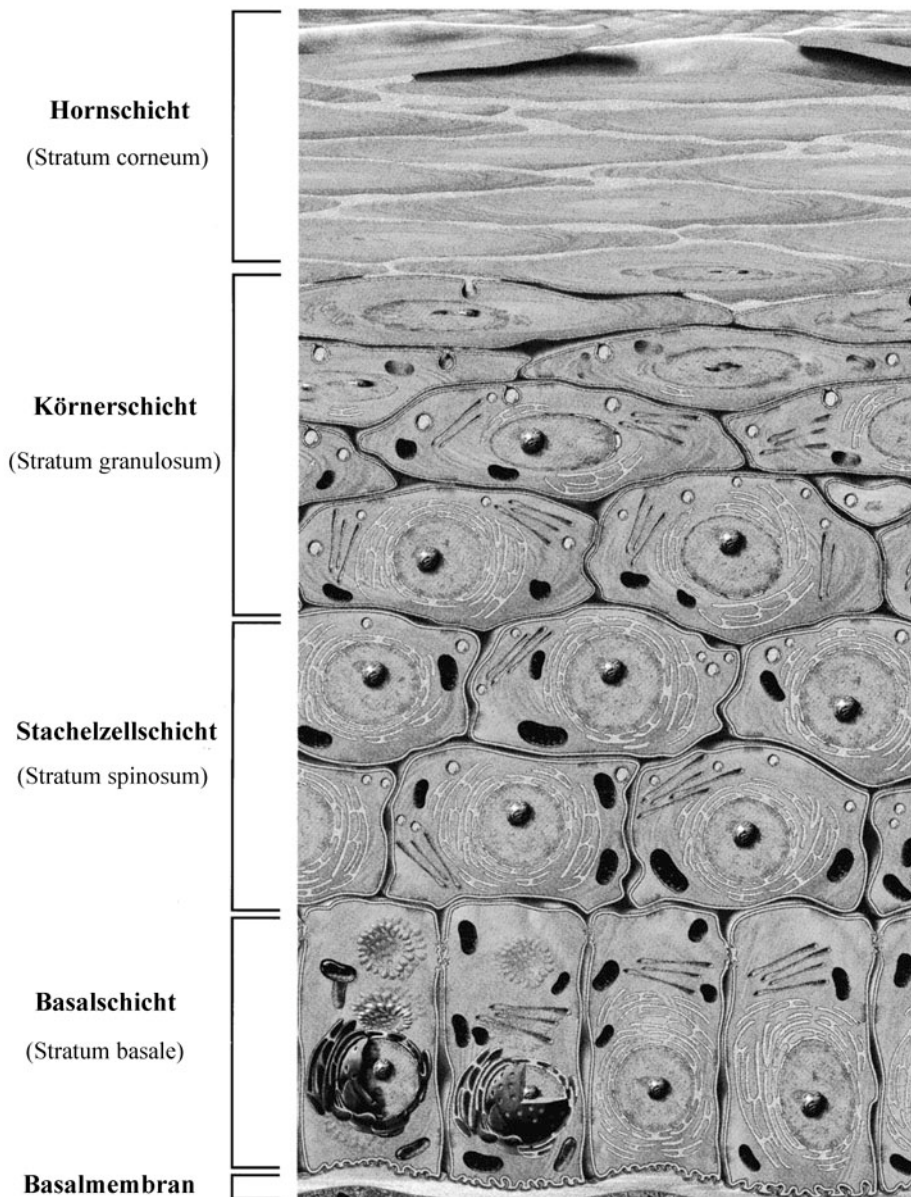


Abb. 7: Hautmodell aus [Derma, BDF 1998].

Das Stratum corneum, welches die äußerste Schicht der Haut darstellt, besteht aus 10-20 Zellagen, deren Zellen (Corneozyten) eine Dicke von nur noch 0,2µm-1,5µm aufweisen. Die Corneozyten bestehen dabei fast vollständig aus Keratin und werden von einer Envelope aus Proteinen und kovalent gebundenen Lipiden umgeben [Swartzendruber,1987][Wertz, 1989]. In den Zwischenräumen der Corneozyten haben sich die im Stratum granulosum ausgeschütteten Lipide zu lamellaren Schichten angeordnet. Die Corneozyten werden durch Desmosomen

zusammengehalten, die zur Oberfläche hin enzymatisch abgebaut werden. Dadurch setzt in den obersten Schichten ein Abschuppen einzelner Corneozyten ein (Desquamation). Durch diesen Prozeß der Differenzierung und Desquamation erneuert sich die Epidermis der Haut in ca. 4 Wochen einmal vollständig [Landmann, 1991] [Chapman, 1990].

3.3.2 Die Penetrationsbarriere der Haut

Einen wirksamen Schutz vor dem transepidermalen Wasserverlust bilden der untere Bereich des Stratum corneums und die oberen Zellagen des Stratum granulosum. Hier befinden sich sowohl verhornte Keratinozyten als auch Lipidlamellen. Die Lipidlamellen füllen den gesamten Zellzwischenraum aus und mindern aufgrund ihrer Hydrophobie somit die Diffusion des Wasser nach außen. Die Lipide werden daher auch als Barrierelipide der Haut bezeichnet [Landmann, 1991][Elias, 1983, 1991].

Die Diffusion durch das Stratum corneum topisch applizierter Substanzen wird ebenfalls in erster Linie durch die Lipidmatrix bestimmt. Aus diesem Grund penetrieren in der Regel lipophile besser als hydrophile Substanzen [Elias, 1981][Forslind, 1997].

Zwei grundsätzliche Wege zur Penetration von Substanzen existieren dabei. Zum einen können Stoffe über Hautanhangsgebilde, wie Haarwurzel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen in tiefere Schichten der Haut gelangen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, das Stratum corneum der Epidermis durch den lipidhaltigen Interzellularraum oder durch die hydrophile Proteinstruktur der Corneozyten zu überwinden (transepidermale Diffusion). Das „Domain Mosaic Model“ von Bo Forslind bietet einen molekularen Ansatz zur Klärung des Diffusionsverhalten der Epidermis. Hier wird angenommen, daß die Barrierelipide sowohl in einer kristallinen festen Phase als auch in einer flüssig-kristallinen Phase vorliegen können.

Die beiden Phasen bilden ein mosaikartiges Muster, durch welches vor allem durch die permeableren flüssig-kristallinen Bereiche Substanzen diffundieren können. Der relativ zueinander vorliegende Anteil der beiden Phasen hängt von Temperatur und Druck ab und kann durch bestimmte Substanzen beeinflusst werden [Forslind, 1997].

Je nach Anteil der Phasen kann eine Erhöhung oder Verringerung der Penetrationsmöglichkeit von Substanzen vorliegen. Dieses Modell liefert eine Erklärung für die Regulierung des transepidermalen Wasserverlustes. Hier bewirkt ein Quellen der Corneozyten durch Wasseraufnahme eine Umordnung der flüssig-kristallinen Phase in die feste Phase, weil der Druck lokal ansteigt. Die Verringerung des flüssig-kristallinen Anteils bewirkt wiederum eine geringere Diffusion des Wassers. Somit wird eine selbststeuernde Regulierung des Wasserhaushaltes geschaffen [Forslind 1994, 1997].

3.3.3 Wechselwirkung mit Licht

Die Epidermis dient aber nicht nur als Penetrationsbarriere, sondern auch als natürlicher Lichtschutz gegen ultraviolette Strahlung [Kindl, 1988]. Bei erhöhter Einstrahlung von UV-Licht kommt es sowohl zu einer Verdickung des Stratum corneums als auch zur Bildung lichtabsorbierender Melaninpigmente.

Man unterteilt das UV-Licht in drei Bereiche (siehe Tab. 1). Je länger die Wellenlänge der Strahlung desto größer ist die Eindringtiefe in die Haut. So wird UVC-Strahlung schon im Stratum corneum absorbiert. UVA und UVB-Strahlung können allerdings den noch lebenden Bereich der Haut erreichen und damit dort Schädigungen hervorrufen. Wenn der natürliche Schutz nicht ausreicht, kann durch Anwendung von Sonnenschutzcremes die Transmission der UV-Strahlung herabgesetzt werden. Dafür werden absorbierende, reflektierende und streuende Substanzen in kosmetische Emulsionen eingearbeitet, die einen möglichst großen Bereich des UV-Lichtes wirkungsvoll abdecken sollten [Kindl, 1988].

UVA	UVB	UVC
315-380nm	280-315nm	100-280nm

Tab. 1: Wellenlängenbereiche des UV-Lichtes.

3.3.4 UV-Filter

Es werden zwei Arten von UV-Filtern voneinander unterschieden. Anorganische Lichtfilter, wie Zinkoxid und Titandioxid, werden oftmals in Pigmentform verarbeitet. Derartige Lichtfilter besitzen streuende, reflektierende und absorbierende Wirkung

auf das UV-Licht. Organische Lichtfilter, bei denen es sich meist um aromatische Verbindungen handelt, zeigen aufgrund ihrer Elektronenstruktur überwiegend reine Absorption im UV-Bereich. In kosmetischen Produkten treten oft Kombinationen von verschiedenen Lichtfiltern auf, um den gesamten UV-Bereich abzudecken [Kindl, 1988].

Eine standardisierte Methode, die Penetration von Substanzen zu untersuchen, ist die sogenannte Stripping-Methode, bei der Zellagen des Stratum corneums durch Anpressen eines Klebebandes und Abstreifen desselben gewonnen werden können [Diembeck, 1995]. Durch wiederholtes Anwenden der Prozedur gelangt man zu immer tieferliegenden Schichten. Nun können die erhaltenen Hautstrips massenspektroskopisch oder chromatographisch untersucht werden und die ermittelten Mengen der einzelnen Hautstrips der Tiefe in der Haut zugeordnet werden. Dadurch kann bestimmt werden, ob eine Substanz die Penetrationsbarriere überwindet. Einen genauen Aufenthalt des Lichtfilters in der Haut kann diese Methode allerdings nicht liefern.

3.4 Haare

3.4.1 Allgemeines

Ein Mensch besitzt etwa 100000 Haarfollikel auf seinem Kopf, aus denen Haare wachsen [Schueller, 1999]. In der anagenen Phase (Wachstumsphase) des Follikels werden in diesem Zellen gebildet, die sich durch Mitose vermehren [Kassenbeck, 1991].

Der Haarbalg mit Haarpapille ist dabei für die Nährstoffversorgung der sich bildenden Zellen verantwortlich. Die Vermehrung der Zellen zwingt, die Zellen sich in Richtung Follikelmündung zu bewegen. Dabei vollzieht sich eine Differentiation, welche die Bildung von den drei Regionen; Medulla, Cortex und Cuticula zur Folge hat.

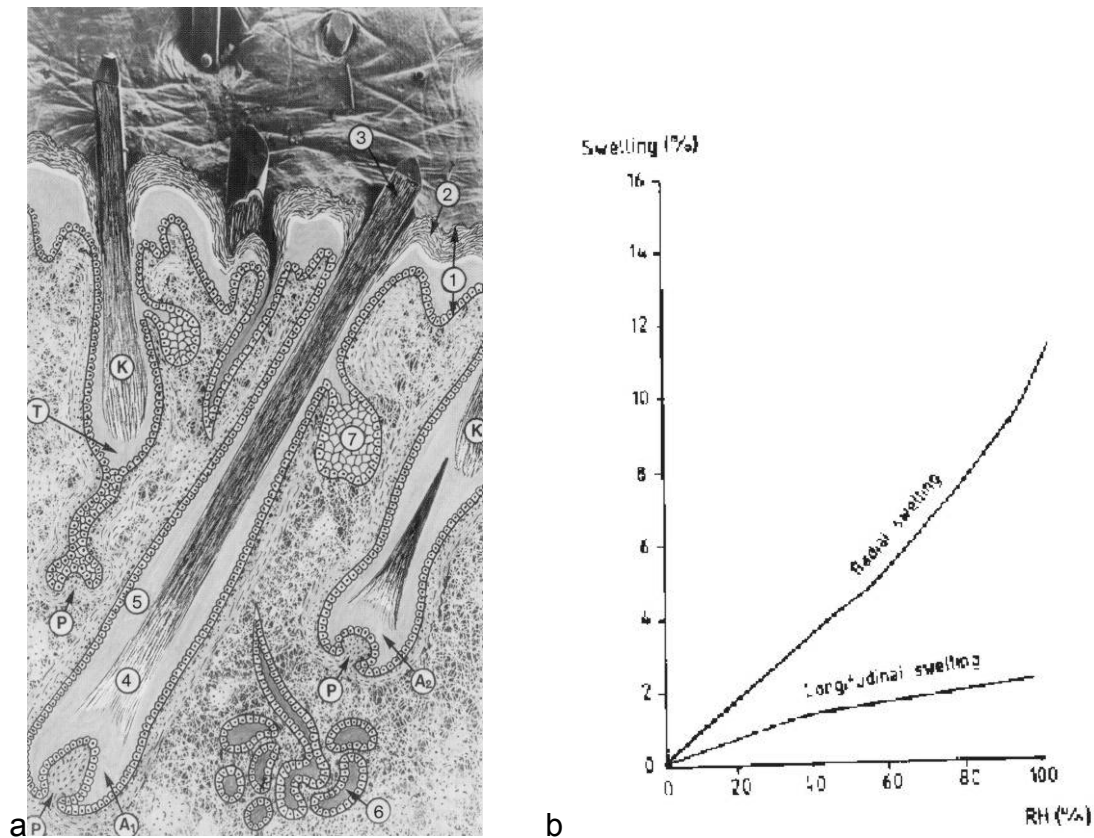


Abb. 8: a) Haarfollikel aus [Schwan-Jonczyk, 1999], 1 Oberhaut, 2 Hornschicht, 3 Haarschaft, 4 Haarwurzel, 5 Wurzelscheide, 6 Schweißdrüse, 7 Talgdrüse, A₁ Haarfollikel in anagener Phase, A₂ Beginn der anagenen Phase, T telogene Phase, K Kolbenhaar (nicht mehr wachsendes Haar), P Papille, b) Volumenänderung von Haaren in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit, aus [Zviak, 1986].

Die Zellen nehmen unterschiedliche Gestalt an, wie in Abschnitt 3.4.3 noch beschrieben wird. Oberhalb dieser Differenzierungszone beginnen die Zellen zu keratinisieren. Dies bedeutet, daß die Zellen dehydrieren und eine vermehrte Proteinbildung in ihnen stattfindet. Die Proteine vernetzen nun miteinander, so daß diese regelrecht aushärten. Auf diese Weise sterben die Zellen ab und bilden ein steifes zylinderförmiges Gebilde außerhalb des Follikels. Die Bildung von weiteren Zellen nahe der Haarpapille bedingt ein Herausdrücken des keratinisierten Bereiches des Haares, so daß das Haar langsam an Länge gewinnt [Kassenbeck, 1991]. Die Wachstumsgeschwindigkeit beträgt dabei durchschnittlich 1cm im Monat. Dadurch können bei einer Dauer der anagenen Phase von 2-6 Jahren 50-100 cm lange Haare entstehen, deren Durchmesser mit 40-120 µm stark variieren kann [Robbins, 1994].

Nach dieser Zeit setzt eine kurze Übergangsphase, catagene Phase, ein bis in der 3-6 monatigen telogenen Phase keine Zellen mehr gebildet werden. Das Haar bleibt im Follikel stecken, bis die anagene Phase wieder einsetzt und neue Zellen langsam

das Haar herausdrängen und ein neues Haar bilden. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 8a ein Haarfollikel mit Haarschaft abgebildet.

3.4.2 Chemische Zusammensetzung

Die wichtigsten Bestandteile im Haar sind Wasser (ca.12%), Proteine (ca. 90%) und Lipide (ca.5%) [Schwan-Jonczyk, 1999]. Die Proteine sind durch den Keratinisierungsprozeß bei Haarwachstum miteinander vernetzt. Dies geschieht im wesentlichen durch die Bildung von Cystin aus zwei Cysteinen⁸, die sich über eine Disulfidbrücke verknüpfen. Der Cystingehalt bestimmt daher die Stärke der Vernetzung und somit auch die mechanischen Eigenschaften der jeweiligen Region eines Haares. Eine weitere Bindungsart zwischen zwei Aminosäuren stellt die Salzbrücke dar, deren Stärke extrem von dem Umgebungsmedium abhängt, da sie elektrostatischer Natur ist. Durch Protonierung oder Deprotonierung der für die Bindung verantwortlichen Funktionalgruppen kann diese Art der Verknüpfung aufgehoben werden. Auch auftretende Wasserstoffbrückenbindungen sind keineswegs stabil im Haar, da diese Bindungen ebenfalls durch Einlagerung von Wassermolekülen unterbrochen werden können [Zviak, 1986]. Daraus ergeben sich Konsequenzen für ein Haar in wäßriger Umgebung bezüglich der Diffusion von Substanzen, auf die in Kapitel 3.4.4 eingegangen wird. Das Haar ist hygroskopisch und quillt in Flüssigkeiten stark. Die Änderung der relativen Luftfeuchtigkeit der Umgebung genügt, um eine Vergrößerung des Volumens hervorzurufen, wie es in Abb. 8b dargestellt wird [Zviak, 1986]. Dabei quillt das Haar radial stärker als longitudinal.

3.4.3 Haarmorphologie

Ein Haar besteht hauptsächlich aus drei Regionen (Abb. 9). Im Zentrum des Haarschaftes befindet sich der Markkanal, die Medulla, welche eine höhlenartige Struktur aufweist und in erster Linie aus Zellwänden besteht. Die Medulla verläuft parallel zur Haarachse und besitzt einen Durchmesser von wenigen Mikrometern. Da die Medulla nur bei dickeren Haaren auftritt und nur geringen Einfluß auf die

⁸ Schwefelhaltige Aminosäure

physikalischen Eigenschaften besitzt [Kassenbeck, 1991][Robbins, 1994], wird im folgenden nur auf den Cortex und die Cuticula eingegangen.

Cortex

Sehr viel bedeutender als die Medulla ist der Faserstamm des Haares, der Cortex. Er macht ca. 75% des Haarvolumens aus und besteht aus länglichen Cortexzellen, die miteinander fest verzahnt sind. Diese besitzen einen Durchmesser von 1-6 μm und können bis zu 100 μm lang sein [Robbins, 1994]. Der innere Aufbau dieser Zellen ist fibrillenartig. Die sogenannten Makrofibrillen, die einen Durchmesser von 0,1–0,4 μm besitzen, verlaufen parallel zur Haarachse. Sie setzen sich aus Intermediärfilamenten IF (ca. 7nm Durchmesser), die sich in einer stark vernetzten Proteinmatrix befinden, zusammen. Eine weitere Unterteilung der Intermediärfilament in Protofilamente und deren molekulare Zusammensetzung wird in [ZAHN, 1997] dargestellt. Die Matrixproteine, welche auch als IF-assoziierte Proteine bezeichnet werden, zeichnen sich durch hohe Anteile von Cystin oder Glycin beziehungsweise Tyrosin aus [Frantini, 1993]. Es existieren zwei Zelltypen von Cortexzellen, die sich durch den Anteil an IF-assoziierten Proteinen unterscheiden. Bei orthocorticalen Zellen, die einen geringen Anteil besitzen, erscheint die fibrillenartige Struktur sehr viel deutlicher als bei den paracorticalen Zellen, deren Anteil an stark vernetzten Matrixproteinen hoch ist. Es treten bei Humanhaaren allerdings auch Mischformen dieser Typen mit fließendem Übergang auf [Kassenbeck, 1991]. Jede Cortexzelle wird von einer resistenten Membran (cornified envelope) umgeben, welche zum Zellmembrankomplex (ZMK) gehört. Der ZMK bezeichnet die unmittelbare Region zwischen zwei angrenzenden Zellen und beinhaltet zusätzlich zum cornified envelope interzelluläre Proteine und Lipide [Zahn, 1984][Wortmann, 1997]. Außerdem befinden sich im Cortex noch Zellkernreste und Farbpigmente, die aus Melanin bestehen. Diese Pigmente sind für die Farbe des Haares verantwortlich [Robbins, 1992]. Melanin ist bekannt für seine Absorption im gesamten Spektralbereich des Lichtes. Die genaue Zusammensetzung und die Größe der Pigmente, die von 0,3-0,8 μm variieren kann, bestimmen das Streu- und Absorptionsverhalten des Haares. Dadurch kommen zahlreiche natürliche Farbnuancen von Humanhaaren zustande [Wolfram, 1987][Kassenbeck, 1991].

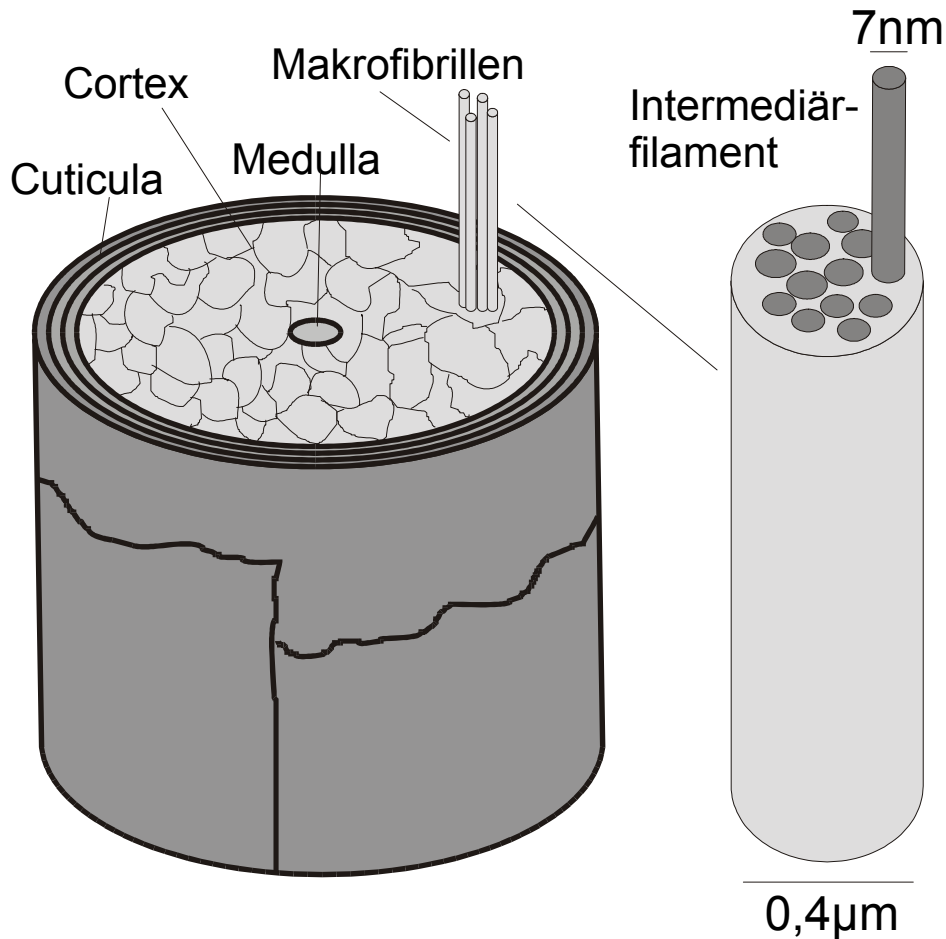


Abb. 9: Vereinfachtes Haarmodell nach [ZAHN, 1997].

Cuticula

Die äußere schuppenartige Schicht eines Haares wird als Cuticula bezeichnet. Sie umgibt den Cortex und bietet aufgrund ihrer chemischen Resistenz und mechanischen Stabilität diesem Schutz gegen äußere Einflüsse. Die Cuticula setzt sich aus flachen übereinanderlappenden Cuticulazellen zusammen, die eine Größe von $48 \mu\text{m} \times 32 \mu\text{m}$ und eine Dicke von $0,4 \mu\text{m}$ besitzen. Diese Abmessungen sind Mittelwerte nach Paul Kassenbeck und können daher auch im Einzelfall stark von der Realität abweichen [Kassenbeck, 1991]. Die Oberfläche eines Haares ist in einer REM-Aufnahme dargestellt, um die Schuppenstruktur zu verdeutlichen (Abb. 10). Die einzelnen Cuticulazellen sind schichtartig aufgebaut. Die äußerste Schicht enthält kovalent gebundene Lipide, welche den F-Layer ergeben [Zahn, 1997][Negri, 1996]. Der F-Layer in Verbindung mit dem cystinreichen A-Layer wird auch als Epicuticula bezeichnet und ähnelt im Aufbau dem cornified envelope von Corneozyten im Stratum corneum der Epidermis [Zahn, 1997]. Die darunterliegende Exocuticula zählt wie der A-Layer zu den stark vernetzten Bereichen des Haares. Dagegen wird die Endocuticula, die Rückstände verschiedener Zellbestandteile wie Zellkern und

Mitochondrien enthält und nur einen geringen Cystingehalt aufweist, den nicht-keratinischen Zonen zugewiesen. Zu diesen gehört auch der ZMK mit seinen Lipiden und cystinarmen Proteinen zwischen zwei Cuticulazellen [Robbins, 1994][Zviak, 1986].

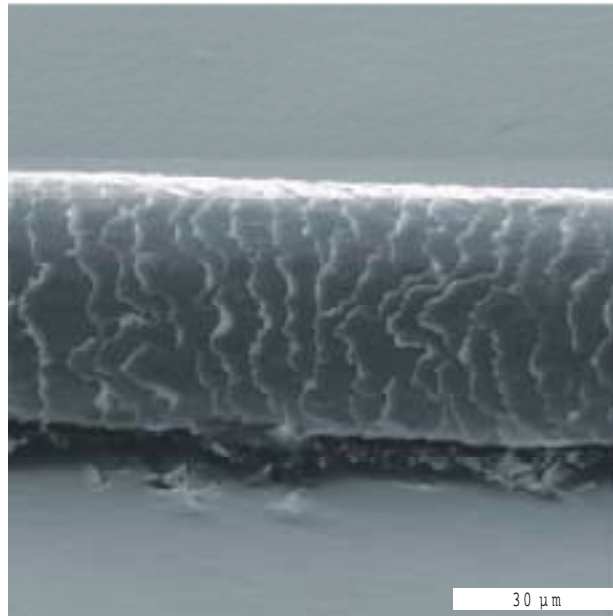


Abb. 10: REM-Aufnahme eines Humanhaares, welches mit 10nm Gold bedampft wurde. Die Kanten der Cuticulazellen sind deutlich zu erkennen.

3.4.4 Betrachtungen zur Diffusion in das Haarinnere

Die Diffusion von Substanzen aus Flüssigkeiten ins Haarinnere kann sich über zwei mögliche Penetrationswege vollziehen. Einerseits können Moleküle durch die einzelnen Schichten der Cuticulazellen diffundieren und so das Haarinnere erreichen. Dieser transzelluläre Weg ist in erster Linie nur für relativ kleine Moleküle wahrscheinlich [Robbins, 1994].

Andererseits kann der ZMK mit seinem interzellulären Material als Transportweg dienen. Diese Art der Penetration wird als interzelluläre Diffusion bezeichnet [Brady, 1992]. Die Moleküle passieren die Cuticula nur durch das interzelluläre Material bis sie zum Cortex gelangt sind. Im Cortex fungiert ebenfalls vorwiegend der ZMK als Transportweg. Eine Art Mischform beider Penetrationswege ist der sogenannte eingeschränkt transzelluläre Weg [Wortmann, 1997]. Hier bahnen sich die Moleküle den Weg durch alle Bereiche des Haares, welche zu den nicht-keratinischen Zonen

gehören. In der Cuticula ist dieses vor allem die Endocuticula, die in wässrigen Lösungen stark quellen kann (siehe Kapitel 3.4.1). Der ZMK spielt hier eine untergeordnetere Rolle. Erst wenn die Moleküle den Cortex erreicht haben, diffundieren sie vorwiegend entlang des ZMK weiter ins Zentrum des Haars [Wortmann, 1997]. Nach längeren Penetrationszeiten gelangen die Moleküle dann von den schwefelarmen Regionen zu den Schwefelreichen [Kamath, 1995][Robbins, 1994] (siehe Abb. 11).

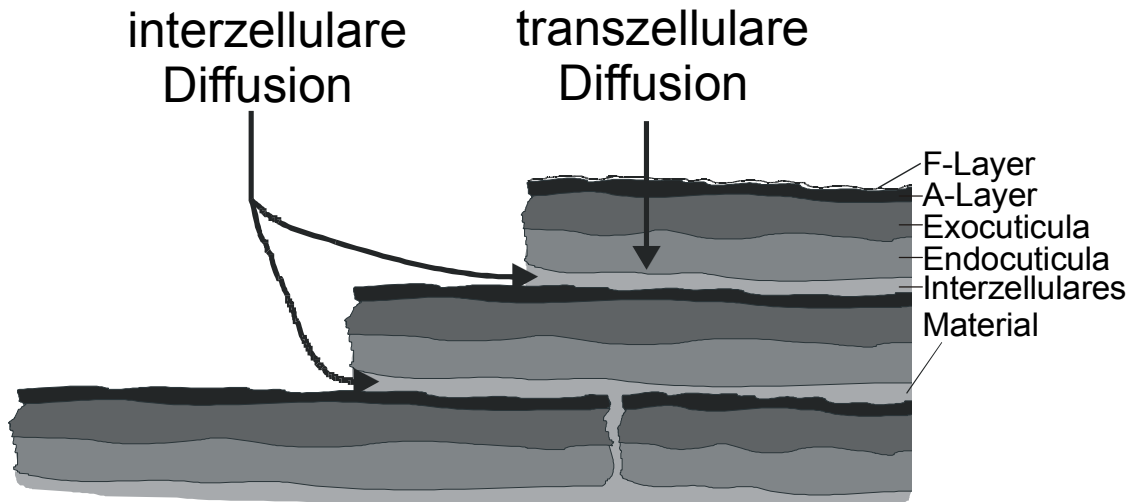


Abb. 11: Veranschaulichung der Diffusionswege durch die Cuticula in das Haarinnere.

4 Material und Methoden

4.1 Aufbau des nahfeldoptischen Mikroskops

Das NFOM, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, basiert auf einem kommerziell erhältlichen Mikroskop der Firma Topometrix. Das Mikroskop wurde aufgrund der relativ schlechten UV-Tauglichkeit bei 300nm leicht modifiziert. Der endgültige Aufbau ist in Abb. 12 schematisch skizziert.

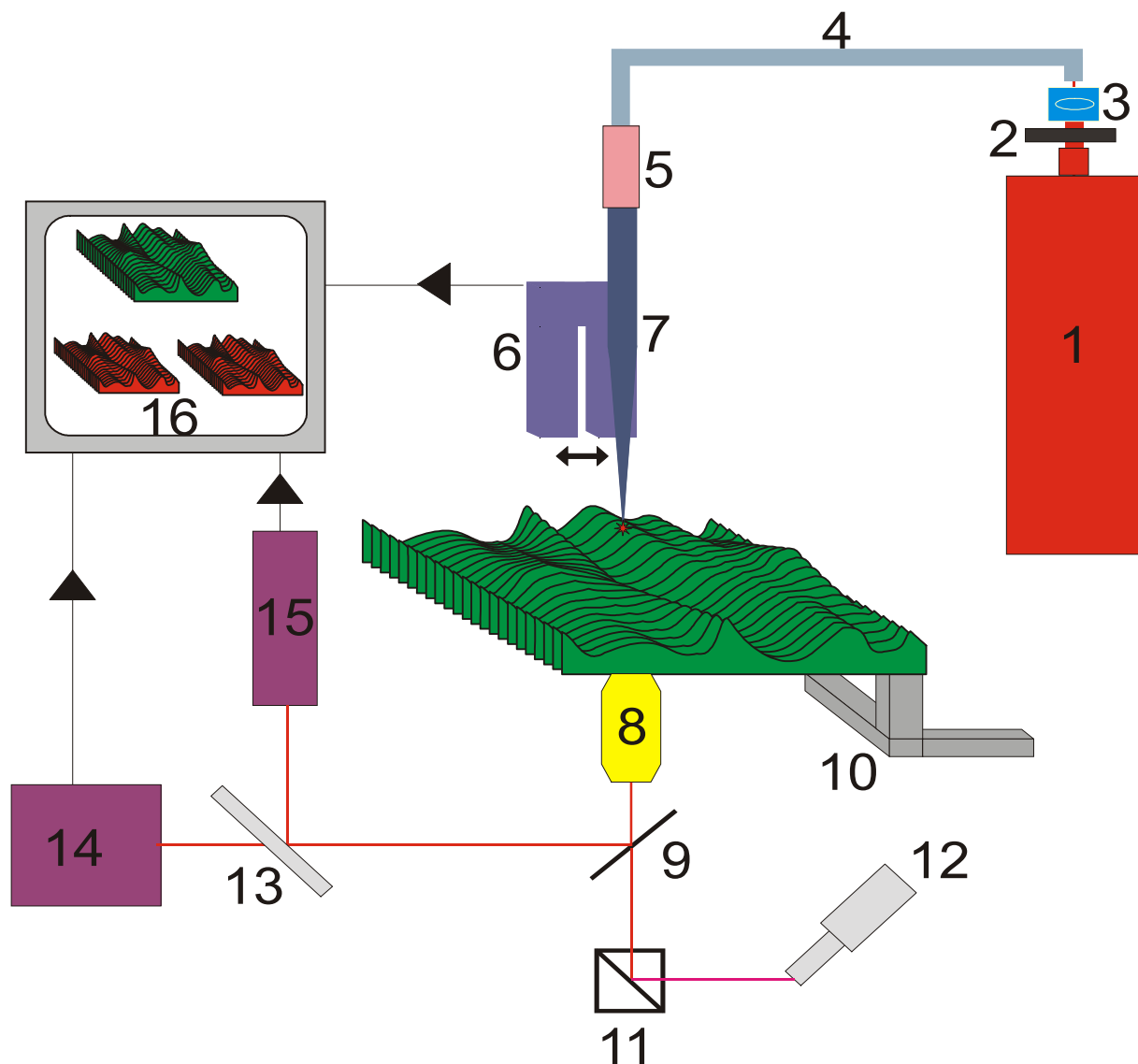


Abb. 12: Schematischer Aufbau des NFOM. 1 Argon-Laser, 2 Abschwächer, 3 Einkoppeloptik, 4 Glasfaser, 5 Fasersplice, 6 Quarzstimmgabel, 7 spitz zulaufende Glasfaser, 8 Objektiv, 9 verkippbare Spiegel, 10 Piezoscanner, 11 Umlenkprisma, 12 Okular, 13 Beamsampler, 14 Single Photon Counter, 15 Photomultiplier, 16 digitale Datenverarbeitung und elektronische Steuerung.

Das „Lumina“ besitzt ein konventionelles Lichtmikroskop (Eclipse, Nikon) als Grundkörper. Oberhalb des Objektivrevolvers sorgt ein Verschiebetisch, der durch drei Piezoelemente bewegt werden kann, für die notwendige Verschiebung der Probe in alle drei Raumrichtungen. Der Meßkopf des Lumina gleicht dem des AFM's (Explorer, Topometrix) und kann vor- und zurückgeklappt werden, so daß ein Sondenwechsel einfach durchgeführt werden kann. Der Meßkopf besitzt alle Komponenten des „Explorers“ und kann daher auch als AFM benutzt werden. Für die nahfeldoptischen Messungen wird lediglich ein spezieller Halter mit Anregungspiezo in dem Meßkopf fixiert. Dieser Halter regt die Sonde zur Oszillation an und ermöglicht das Messen des Stromsignals, welches durch die Quarzstimmgabel der Sonde erzeugt wird. Ein Photomultiplier (R374, Hamamatsu), der sich an einem Lichtmikroskopausgang befindet, dient als Lichtdetektor. Das Licht wird dafür über ein Prisma um 90° auf den photoempfindlichen Bereich des Photomultipliers umgelenkt. Ein zweites Umlenkprisma kann ebenfalls in den Strahlengang geführt werden, welches das Licht in Richtung Okular ablenkt. Das Mikroskop ist damit auch weiterhin für die klassische Lichtmikroskopie tauglich. Die elektronische Steuereinheit sowie die dazugehörige Software stammt ebenfalls von Topometrix.

Da die Messungen sowohl im sichtbaren Bereich als im UV-Bereich durchgeführt werden sollten, wurde ein leistungsstarker Argon-Laser (Sabre DBW20, Coherent) benutzt. Dieser wassergekühlte Laser kann bei maximal 60A Röhrenstrom über 10W Lichtleistung im sichtbaren und 2W im ultravioletten Bereich liefern. Zu tieferen Wellenlängen nimmt die Lichtleistung drastisch ab, so daß bei 275nm nur noch ca. 200mW zur Verfügung standen. Alle Wellenlängen mit maximal erreichten Leistungen sind in Tab. 2 aufgeführt.

Wellenlänge [nm]	Leistung [W]
514	10
501	10
496	10
488	10
454	5
364	1,9
351	1,9
305	0,4
302	0,4

Tab. 2: Lichtleistung des Lasers Sabre 20DBW, die mindestens erzielt wurde.

Ein Abschwächersystem (Vision) bestehend aus Graufiltern unterschiedlicher optischer Dichte wurde am Lichtausgang des Lasers befestigt, damit das Licht auf die gewünschte Leistung reduziert werden konnte. Die Graufilter sind dabei für alle Wellenlängen bis in den tiefen UV-Bereich ähnlich transparent. Die Abschwächung der Lichtleistung ist notwendig, um den Laser bei hoher Leistung laufen lassen zu können. Bei zu geringen Laserleistungen können enorme Schwankungen in der Lichtleistung auftreten, die während der Messung stören.

Als Einkopplungsoptik wurde ein UV-taugliches System (Spindler&Hoyer) bestehend aus einer fokussierenden Bikonvexlinse und einer durch 3 Schrauben verkippbaren Fasersteckverbindung (FC-Steckersystem) verwendet. Das Laserlicht kann hiermit in eine einmodige Lichtleitfaser mit Kerndurchmesser im Mikrometerbereich bei einer Effizienz von 50% eingekoppelt werden. Diese Optik wurde für alle Wellenlängen benutzt, obwohl sie für 320nm optimiert ist. Dadurch ergeben sich sehr unterschiedliche Einkoppeleffizienzen für die verschiedenen Wellenlängen. Zu längeren Wellenlängen hin nimmt die Effizienz durch die chromatische Aberration der Linse ab, jedoch konnte diese Abnahme durch die hohe Lichtleistung des Lasers im sichtbaren Bereich kompensiert werden. Deshalb wurde auf ein Austauschen der Einkoppeloptik mit einer für den sichtbaren Bereich optimierten Optik in der Regel verzichtet.

Als Lichtleitfaser wurden jeweils eine einmodige Faser (OZ-Optics) für Messungen mit UV-Licht und sichtbarem Licht benutzt, in denen sich Licht durch Totalreflexion am Übergang zwischen Faserkern und Fasermantel wellenförmig ausbreiten kann. Die UV-Faser zeichnet sich dadurch aus, daß sie aus Quarzglas besteht und einen Kerndurchmesser von $3\mu\text{m}$ als Ausbreitungskanal des Lichtes besitzt. Ihre cut-off-Wellenlänge⁹ beträgt 320nm, so daß nur oberhalb dieser Wellenlänge eine Mode¹⁰ des Lichtes geführt wird. Für kürzere Wellenlängen können sich zusätzliche Moden ausbreiten. Die Faser für den sichtbaren Bereich besitzt dagegen einen Kerndurchmesser von $3,5\mu\text{m}$. Auch bei dieser Faser handelt es sich um eine Einmodenfaser, die ihre cut-off-Wellenlänge aber bei 488nm besitzt. Entscheidend für die Verwendung einmodiger Fasern ist allerdings nicht die Ausbreitung von nur

⁹ Cut-off-Wellenlänge ist die Wellenlänge, unterhalb der sich Licht mit nur einer Mode im Kern ausbreiten kann.

¹⁰ Mode bedeutet hier eine ausbreitungsfähige Feldverteilung im Faserkern.

einer Mode, sondern die Tatsache, daß die gebräuchlichen NFOM-Sonden ebenfalls aus einmodigen Glasfasern hergestellt werden (siehe unten). Damit Licht von der Lichtleitfaser in die Fasersonden effizient eingekoppelt werden kann, darf der Kerndurchmesser der Lichtleitfaser nicht größer sein als der Faserkerndurchmesser der NFOM-Sonde.

Für die Einkopplung des Lichtes von der Lichtleitfaser zur NFOM-Sonde wurde ein Fasersplice (Sicor) und ein sogenannter Bare-Fiber-Koppler (Lasercomponents) benutzt. Beim Fasersplice werden zwei Faserenden derart aneinander geführt, daß die Faserkerne exakt gegenüberliegen und somit Licht von der einen Faser in den Kern der zweiten Faser einfallen kann. Das Licht kann sich nun wieder durch Totalreflexion in der zweiten Faser ausbreiten. Für die Art der Kopplung sind zwei glatte Enden der Fasern notwendig, damit die Faserenden möglichst nah aneinander liegen können. Für das Erzeugen glatter Faserenden wurde ein Cleaver (Sicor) benutzt, bei dem die Faser durch eine scharfe Keramik Klinge angeritzt und durch leichtes Verbiegen der Faser ein glatter Bruch erzeugt wird. Beim Bare-Fiber-Koppler konnte auch eine Faser mit FC-Stecker an eine Faser ohne Abschlußstecker verbunden werden. Dies geschieht ebenfalls durch eine Führung, in welche die Faser ohne FC-Stecker hingeschoben wird und in den Kontakt mit dem FC-Stecker der zweiten Faser gebracht wird. Die hiermit erreichten Einkoppleffizienzen liegen je nach Qualität der Bruchstellen bei ungefähr 80%.

Als NFOM-Sonden wurden Glasfasersonden benutzt, die einen Aperturdurchmesser von 50-100nm nach Herstellerangaben besitzen. Die einmodigen Glasfasern besitzen einen 4µm Faserkern mit einer cut-off-Wellenlänge von 633nm (3M). Aus derartigen Fasern werden durch lokale Erwärmung spitzzulaufende Faserenden gezogen, die anschließend unter einem Winkel von ca. 90° mit Aluminium beschichtet werden. Durch diesen Prozeß werden lichtdurchlässige Aperturen von 50-100nm erzeugt. Die Dicke der Aluminiumschicht beträgt 100nm, so daß kein Licht seitlich aus der Faser austreten kann. Diese Faserspitze ist an einem Arm einer Quarzstimmgabel befestigt, die durch den piezoelektrischen Effekt bei resonanter Schwingung eine Spannung erzeugt, welche in ein Stromsignal umgewandelt wird und als Maß für die Auslenkung des oszillierenden Armes beziehungsweise der Faserspitze dient. In der Abb. 13a ist eine lichtmikroskopische Aufnahme einer

solchen Sonde zu sehen. Eine REM-Aufnahme einer Faserspitze zeigt die Aluminiumschicht mit der unbeschichteten Öffnung am äußersten Ende, welche bei dieser Spitze einen Durchmesser von ca. 100nm besitzt.

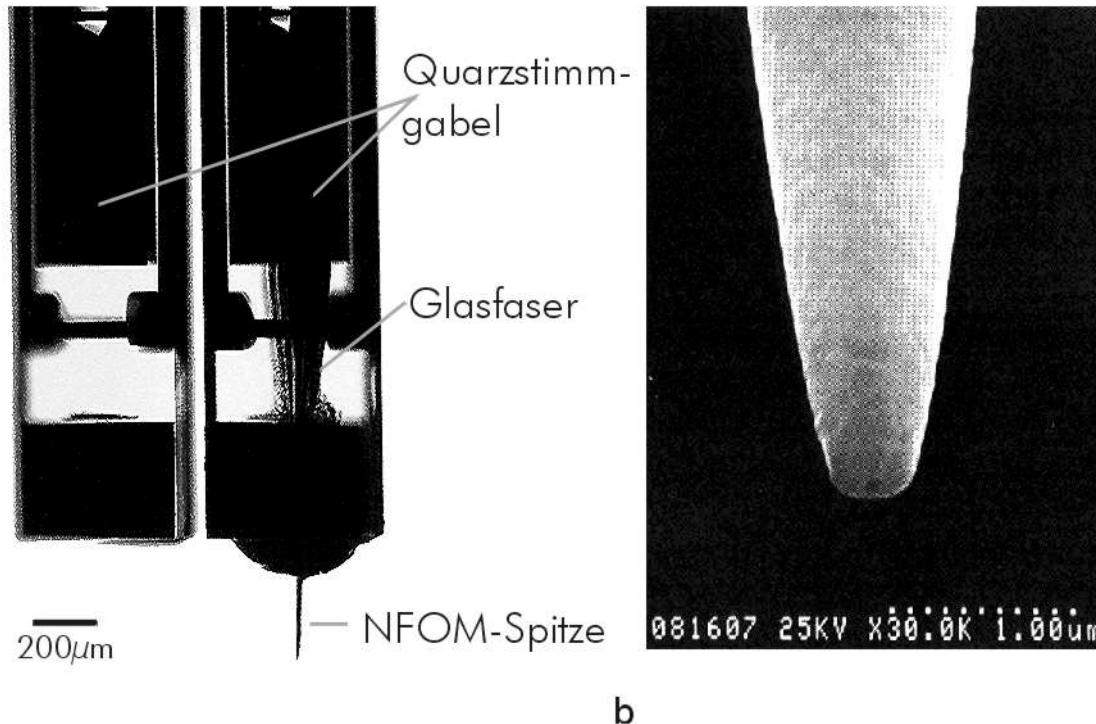


Abb. 13: a) NFOM-Sonde bestehend aus Quarzzstimmgabel und spitzzulaufender Glasfaser. b) REM-Aufnahme einer NFOM-Spitze aus [Isaacson, 1992].

Das durch die Probe transmittierte Licht wird durch ein Objektiv gesammelt. Folgende Objektive wurden für die Messungen verwendet:

- Objektiv mit 40-facher Vergrößerung und NA = 0,65 (Nikon).
- UV-Objektiv mit 40-facher Vergrößerung und NA = 0,8, aus Quarzglaslinsen bestehend (Mikrovid).
- Öbobjektiv mit 100-facher Vergrößerung und NA = 1,3 (Zeiss).

Änderungen am Mikroskop

Da der Photomultiplier R374 (Hamamatsu) bei sehr geringen Lichtleistungen ein starkes Rauschen aufwies (3 nA Dunkelstrom¹¹), wurde ein Single Photon Counter (Witec) an das Mikroskop adaptiert. Diese Einheit basiert ebenfalls auf einem Photomultiplier (H6240, Hamamatsu), der in dieser Betriebsart einen Dunkelstrom von nur 6cps beziehungsweise 0,12nA Kathodenstrom besitzt. Diese Art der

¹¹ Strom, der trotz absoluter Dunkelheit im Photomultiplier fließt. Der Dunkelstrom ist ein Maß für das Rauschen des Photomultipliers.

Lichtdetektion besitzt den Vorteil, geringe Lichtleistungen rauscharm erfassen zu können. Die spektrale Empfindlichkeit ist in Abb. 14 dargestellt. Es wird deutlich, daß bei längeren Wellenlängen die Quanteneffizienz stark abnimmt. Die maximale Sensitivität des H6240 liegt bei 400nm und beträgt 15% Quantenausbeute. Die Quantenausbeute verringert sich zu längeren Wellenlängen hin, so daß bei 500nm nur noch ca. 7% der einfallenden Photonen detektiert werden (Herstellerangaben). Beide Photodetektoren fanden ihren Einsatz in dieser Arbeit, wobei die Fluoreszenzmessung aufgrund der sehr geringen Lichtleistung ausschließlich mit dem H6240 durchgeführt wurden.

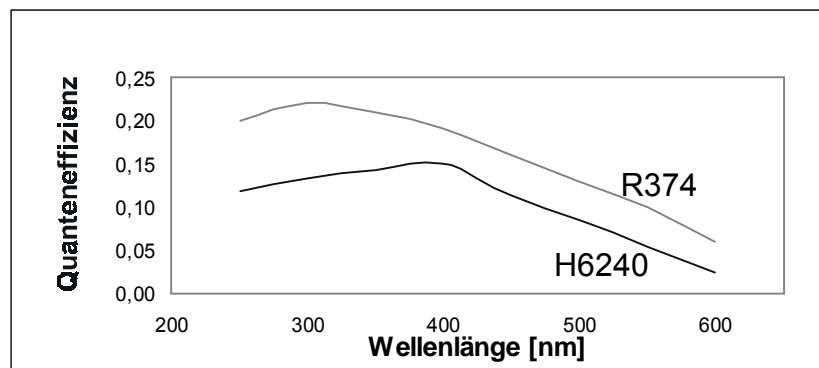


Abb. 14: Spektrale Quantenausbeute der eingesetzten Photomultiplier (nach Herstellerangaben).

Das transmittierte Licht mußte ein Umlenkprisma und zwei Linsen passieren, die im Innern des Lichtmikroskops fest fixiert waren, um vom Photomultiplier detektiert zu werden. Da sich herausstellte, daß diese optischen Komponenten eine Transmission des UV-Lichtes bei 300nm von weniger als 0,002% besitzen, wurde ein verkipperbarer Ablenkspiegel unterhalb des Objektivrevolvers angebracht, der das Licht um 90° ablenken konnte (siehe Abb. 12). Beide Photomultiplier wurden an das Mikroskopgehäuse fixiert, so daß nach Verkippen des Spiegels Licht auf die Photomultiplier eintreffen konnte. Dadurch wurde die UV-untaugliche Optik im Innern des Mikroskopgehäuses umgangen. Die Photomultiplier wurden dabei so angeordnet, daß mit Hilfe eines Beamsamplers (Melles Griot) beide Photomultiplier gleichzeitig das transmittierte Licht detektieren konnten. Der Beamsampler besteht aus einer Quarzglasscheibe, die um 45° verkippt in den Strahlengang gestellt wird. Dadurch wird ein Bruchteil (je nach Wellenlänge 5-10%) des Lichtes um 90° aus dem Strahlengang gelenkt. Durch diese Anordnung war es möglich, gleichzeitig Transmissionsmessungen und Fluoreszenzmessungen durchzuführen.

Auf ein Pinhole vor den Photomultipliern wurde bei diesem Aufbau des Mikroskops verzichtet. Ein Pinhole wird oft in der Nahfeldoptik eingesetzt, um Licht zu reduzieren, welches nicht aus der Fokusebene des Objektivs stammt. Dies führt letztlich zu einer verbesserten Auflösung bei dickeren Proben. Die Proben, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, sind eher als dünn-schichtige Proben anzusehen. Ein Verzicht sollte sich daher nicht nachteilig auf die Auflösung auswirken.

Eingesetzte Filter

Für reine Transmissionsmessungen wurden folgende Bandpaßfilter eingesetzt, um unerwünschtes Umgebungslicht und Fluoreszenzlicht¹² der NFOM-Sonde auszublenden:

- DUG 11x (Schott) für Messungen bei 351nm und 364nm
- Bandpaßfilter, 10lf10-308 (Newport) für Messungen bei 302nm und 305nm

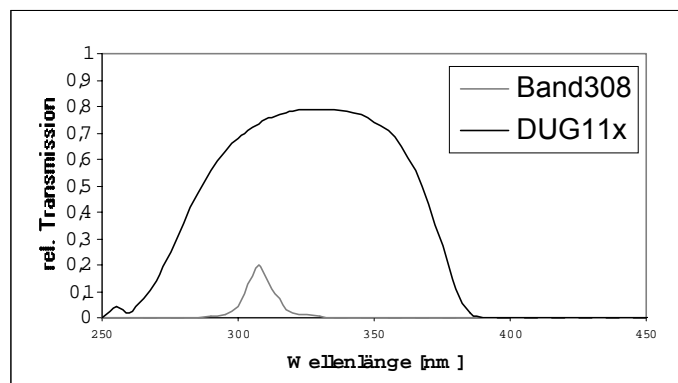


Abb. 15: Relative Transmissionskurven verwendeter Filter nach Herstellerangaben.

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit zwei Langpaß-Kantenfiltern durchgeführt, deren Kantenlagen bei 495nm und 515nm (GG495,OG515, Schott) liegen. Bei Messungen mit 496nm als Anregungswellenlänge wurde eine Kombination beider Filter eingesetzt, um eine erhöhte Reduzierung des Anregungslichtes zu erreichen. Die Transmissionskurven beider Filter sind in Abb. 16 abgebildet.

¹² Die Glasfasersonden von Topometrix zeigen eine relativ starke Eigenfluoreszenz bei Verwendung von UV-Licht.

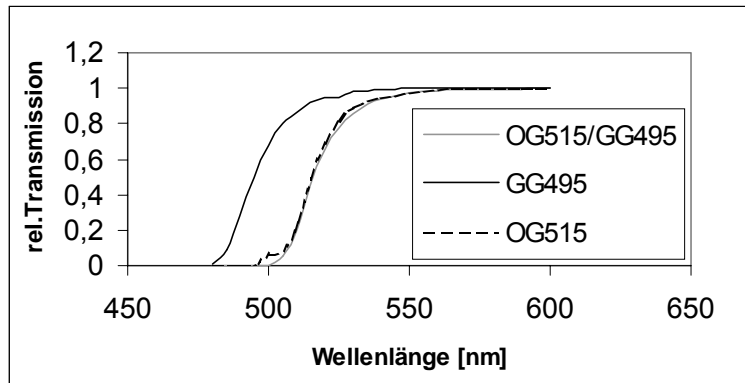


Abb. 16: Transmissionskurven der benutzten Kantenfilter GG495 und OG515 für Fluoreszenzmessungen.

4.2 Ergänzende Methoden

4.2.1 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (RKM, AFM) wurde eingesetzt, um Vergleichsdaten der Topographie der Proben zu erhalten. Hierfür wurde ein AFM (Explorer, Topometrix) benutzt, welches sowohl im Kontaktmodus als auch im Pulsed Force Modus (PFM, Witec) betrieben werden konnte. Die AFM-Bilder, die im Ergebnisteil gezeigt werden, wurden im Kontaktmodus gemessen. Hierfür wurden Silizium-Cantilever mit pyramidalen Spitze eingesetzt (L.O.T.), deren Eigenschaften in Tab. 3 aufgeführt sind.

Federkonstante	0,6-8 N/m
Resonanzfrequenz	50-100kHz
Spitzenradius	<15nm

Tab. 3: Eigenschaften verwendeter Cantilever für AFM-Messungen.

4.2.2 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Für die Messungen am CLSM wurde das TCS von Leica unter Verwendung eines Öbektivs mit 63-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,4 benutzt. Nach Herstellerangaben ist es möglich, mit diesem Mikroskop 180nm große Strukturen mit sichtbarem Licht aufzulösen (mit 488nm, NA= 1,32) [Leica, 1999].

Die Messungen wurden im Slowscanmodus durchgeführt, um genügend Fluoreszenzlicht zu detektieren. Die Laserleistung betrug $25 \mu\text{W}$ am Objektivausgang. Unter Annahme einer Fokusfläche mit 250nm Durchmesser ergibt sich eine Intensität von $5 \cdot 10^8 \text{ W/m}^2$ an der Probenoberfläche. Damit die gleiche Stelle der Probe gefunden werden konnte, die zuvor mit dem NFOM untersucht wurde, wurde die Probe zunächst im Transmissionsmodus ohne Fluoreszenzanregung mit 633nm untersucht. Dadurch konnte sichergestellt werden, daß es beim Auffinden des Bereiches nicht zum Ausbleichen des Farbstoffes kommt. Danach wurde ein Fluoreszenzbild wie oben beschrieben aufgenommen.

4.3 Probenpräparation

In den folgenden Abschnitten wird kurz die Präparation aller Proben beschrieben, die in dieser Arbeit untersucht worden sind.

4.3.1 UV-Filter

Zunächst mußte getestet werden, ob die UV-Filter eine Abschwächung des Lichtes in der Transmissionsmessung liefern. Dafür wurden die reinen Substanzen in einem Lösungsmittel gelöst und ein Tropfen der Lösung auf ein Quarzobjektträgerglas aufgetragen. Nach Verdunstung des Lösungsmittels blieben dünne Schichten der Lichtfiltersubstanzen auf dem Objektträger zurück, die mit dem NFOM untersucht werden konnten.

Des Weiteren wurden UV-Filter in Epon¹³ gelöst. Nach Aushärten des Epons konnten $50\text{-}200\text{nm}$ Dünnschnitte mittels Ultramikrotomie hergestellt werden. Die Dünnschnitte wurden auf ein Quarzglas transferiert und standen nun für Untersuchungen zur Verfügung (siehe Kapitel 4.3.4). Die verwendeten Filter mit maximaler Absorptionswellenlänge und Lösungsmittel, die für NFOM-Untersuchungen eingesetzt wurden, sind in Tab. 4 aufgeführt.

¹³ Epoxidharzgemisch, welches für die Einbettung biologischer Systeme oft verwendet wird.

UV-Filter	max.Absorption [nm]	Lösungsmittel
UVA (Neoheliopan)	360	1% in Wasser
Zinkoxid	360	in Epon
Titandioxid	310	in Epon
Parsol1789	355	in Epon
TinosorbM	360	in Epon

Tab. 4: Verwendete UV-Filter mit maximaler Absorptionswellenlänge und Lösungsmittel, in dem sie mit dem NFOM untersucht wurden. Die Werte stammen aus hausinternen Messungen der Firma Beiersdorf AG.

4.3.2 Applikation eines UV-Filters auf Haut

Für die Applikation eines UV-Filters auf Haut wurden 2mg/cm² Testemulsionen auf einen Hautstanzling aufgetragen, die 4% des UV-Filters enthielten. Die Haut wurde mit Nährlösung während der vierstündigen Applikationszeit feucht gehalten. Danach wurde die Haut, ohne die Emulsion abzuspülen, nach konventioneller Art fixiert und eingebettet. Die Testemulsionen enthielten folgende UVA-Filter:

Parsol1789

Zinkoxid

TinosorbM

4.3.3 Fixierung von Haut

Um Dünnschnitte von Haut herzustellen, muß diese zuvor geeignet fixiert werden, damit die morphologischen Strukturen erhalten bleiben. In dieser Arbeit wurde dafür ein konventionelles Verfahren durchgeführt, bei dem die Haut chemisch fixiert wird.

Eine 2mm Stanzbiopsie humaner Haut wurde mit Osmiumtetroxid chemisch fixiert und durch Ethanolreihen dehydriert. Danach wurde die Haut in Epon eingebettet. Das Epon penetriert in das gesamte Gewebe und härtet langsam aus. Nach ca. drei Tagen bei 60°C entstand ein durchpolymerisierter Eponblock, der mit Hilfe der Ultramikrotomie zu dünnen Schnitten weiterverarbeitet werden konnte. Im folgenden werden die Präparationsschritte aufgelistet, die zur Fixierung des Hautstanzlings durchgeführt wurden.

Konventionelle Hautfixierung:

- Über Nacht in modifizierter Karnowsky Fixierung (1% Paraformaldehyd, 1,25 % Glutaraldehyd und 5,4 mM CaCl_2 in 0,16 M Natriumcacodylat-Puffer, pH7,3) bei 4°C
- 2 mal 10 min in 0,2 M Natriumcacodylat-Puffer, pH7,3 bei Raumtemperatur
- 60 min in Osmiumtetroxidlösung (1% OsO_4 in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer und 0,14 M Kaliumhexacyanoferrat) bei 4°C
- 2 mal 5 min spülen in 0,2 M Natriumcacodylat-Puffer, pH7,3
- 2 mal 10 min in 50% Ethanol
- 2 mal 10 min in 70% Ethanol
- 2 mal 5 min in 95% Ethanol
- 2 mal 20 min in 100% Ethanol
- 2 mal 5 min in Propylenoxid
- 60 min in Epon812/Propylenoxid (1:1)
- 60 min in Epon812/Propylenoxid (2:1)
- 60 min in Epon812 (100%)
- 24h in Epon812 bei 4°C
- 3 d in Epon812 bei 60°C zur Aushärtung des Eponblocks

4.3.4 Präparation dünner Schnitte (Ultramikrotomie)

Für die Präparation dünner Schnitte im Submikrometerbereich wurde ein Ultramikrotom (EMFCS, Leica) unter Verwendung eines Diamantmessers benutzt. Die Harzblöcke wurden zunächst mittels Rasierklinge und Glasmesser zu einer pyramidalen Form getrimmt. Danach wurden Schnitte verschiedener Dicke von 50-200nm mit einem Diamantmesser erzeugt. Die Schnitte gleiten beim Schneidevorgang auf die Oberfläche eines Wasserfilms. Das Wasser befindet sich in einem Trog, an dem auch die Diamantschnittkante integriert ist (Abb. 17). Die Dünnschnitte wurden mit Hilfe einer Kupferdrahtschlinge aus dem Wasser auf einen Glas-Objektträger überführt.

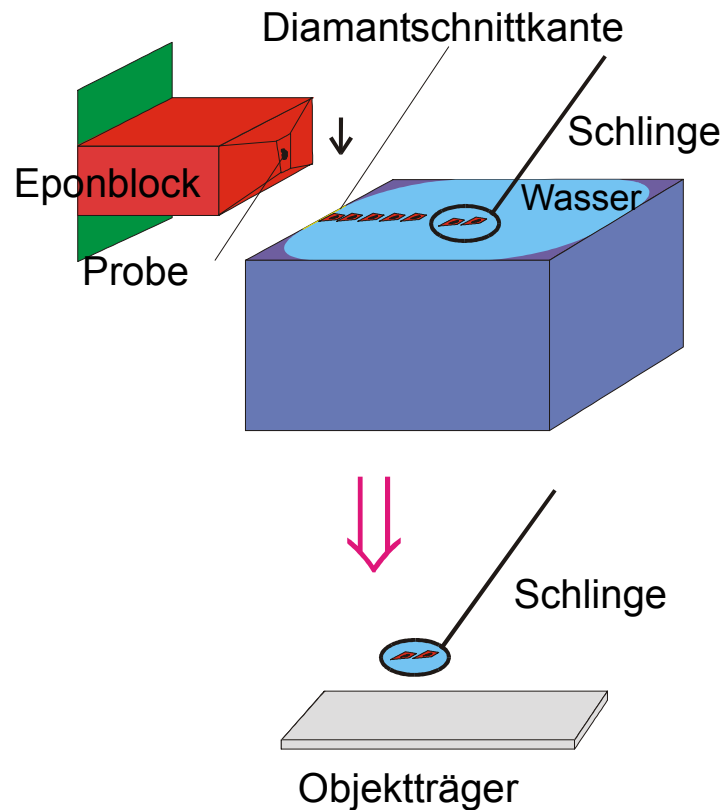


Abb. 17: Schematisiertes Prinzip der Ultramikrotomie. Das „Fischen“ der Dünnschnitte geschieht dabei mit Hilfe einer Kupferschlinge, in der sich ein Wasserfilm bildet. Die Schnitte können dadurch auf einem Objektträger platziert werden.

4.3.5 Immunmarkierung von Hautdünnschnitten

Mit Hilfe der Immunmarkierung ist es möglich, bestimmte Substanzen sehr gezielt mit Fluorophoren zu markieren und damit eine Lokalisation durch die Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen. Für die Markierung werden dabei Antikörper benutzt, die sich an eine zu markierende Substanz binden können. Als Beispiel für eine solche Immunmarkierung wurde das Cytokeratin10¹⁴ in einem 200nm Dünnschnitt humaner Haut angefärbt, welche kryo-fixiert¹⁵ und in HM-20¹⁶ eingebettet wurde. Der Dünnschnitt wurde zunächst in eine Lösung eingetaucht, welche sekundäre Antikörper enthält. Diese sekundären Antikörper binden unspezifisch auf dem Dünnschnitt (Blocking). Nach Abspülen der ungebundenen Antikörper wurde eine Lösung des primären Antikörpers verwendet, die in diesem Fall nur an das Cytokeratin10 der Humanhaut binden (Labelling mit 1. Antikörper). Nach erneutem Abspülen ungebundener Antikörper wurde der Dünnschnitt einer

¹⁴ Protein der Intermediärfilamente einer Zelle, welches nur in der oberen Epidermis zu finden ist.

¹⁵ Fixierung der Haut durch schnelles Einfrieren mit flüssigem Stickstoff bei 2200 bar.

¹⁶ Einbettungsmedium, welches sich für Immunmarkierung eignet.

Lösung mit dem sekundären Antikörper erneut ausgesetzt, die nun allerdings zusätzlich jeweils ein Fluorophor enthalten. Die sekundären Antikörper mit Fluorophor binden spezifisch an die ersten Antikörper, so daß indirekt das Cytokeratin10 mit einem Fluorophor markiert ist. Bei der Präparation wurde jeweils ein Tropfen der benötigten Lösungen auf den Bereich des Deckgläschen pipettiert, in welchem sich die Hautdünnschnitte befanden. Die hierfür benötigten Substanzen und die einzelnen Präparationsschritte werden nun aufgeführt.

Immunmarkierung:

- Blocking: 3% α -mIgG (sekundärer Antikörper ohne Fluorophor) in PBS (Phosphat buffered saline: 10mM Natriumphosphat und 0,15 Natriumchlorid)
- 1 mal Waschen mit 0,1% Tween 20 in PBS für 5min
- Labelling mit 1. Antikörper: α -CK10 in PBS (1:50) für 30min
- 1 mal Waschen mit 0,1% Tween 20 in PBS für 5min
- Labelling mit sekundärem Antikörper: α -mIgG-Alexa488 (Molecular Probes) in PBS (1:500) für 30min
- 1 mal Waschen mit 0,1% Tween 20 in PBS für 5min
- Waschen mit destilliertem Wasser

4.3.6 Penetration eines Fluoresceinderivates in ein Haar

Für die Untersuchung von Diffusionswegen von fluoreszierenden Substanzen in das Haarinnere wurde ein Fluoresceinderivat (Octadecanoylaminofluorescein, Molecular Probes) eingesetzt. Ein frisch ausgerissenes humanes Kopfhaar wurde in eine 1%ige Lösung dieses lipophilen Fluorophors in Methanol für 24h eingetaucht. Danach wurde das Haar für 10s mit Methanol abgespült, um Rückstände auf der Haaroberfläche zu beseitigen. Nach 24h Trocknung an Luft, wurde das Haar in Epon eingebettet. Nach 3 Tagen Aushärten des Eponblocks bei 60°C wurden Dünnschnitte nach oben beschriebener Methode mit dem Ultramikrotom hergestellt und auf Deckgläschen transferiert. Dieses Fluoresceinderivat zeichnet sich durch folgende Anregungs- und Emissionswellenlängen aus: λ_{ex} = 497nm und λ_{em} = 518nm

5 Ergebnisse

5.1 Verbesserung des Mikroskops und Testmessungen

Wie schon in Kapitel 4.1 beschrieben, mußte das kommerzielle System zunächst hinsichtlich seiner optischen Komponenten verbessert werden, weil Transmissionsmessungen bei 300nm und Fluoreszenzmessungen mit dem kommerziellen System nicht möglich waren. Die UV-untauglichen optischen Komponenten wurden mit Hilfe eines verkippbaren Spiegels umgangen, welcher direkt unterhalb des Objektivrevolvers des Mikroskops angebracht wurde. Im Zuge dieser Änderung des Strahlenganges wurde auch ein Single Photon Counter adaptiert, um Messungen bei geringen Lichtleistungen mit hohem Signal-Rauschverhältnis ausführen zu können. Zudem wurde ein Beamsampler in den Strahlengang eingebracht, welcher für eine Teilung des Strahlenganges sorgte und somit Messungen mit zwei Detektoren zur gleichen Zeit ermöglicht. In diesem Kapitel werden Messungen präsentiert, die für die weiteren Ergebnisse und Betrachtungen von grundlegender Bedeutung sind.

5.1.1 Transmission optischer Komponenten des Mikroskops im UV-Bereich

Die wichtigsten optischen Komponenten des Mikroskops wurden hinsichtlich ihrer Transmission mit einem Powermeter (Ophir) untersucht, um die Schwachstellen des Mikroskops aufzufinden und eine Abschätzung der an der Probe auftretenden Lichtleistung und der detektierbaren Leistung geben zu können.

optische Komponente	Transmission 305nm	Transmission 351nm
Lichtleitfaser (320nm)3mLänge	10,00%	40,00%
Lichtleitfaser der Sonde	0,03%	0,30%
Apertur der Sonde *	0,01%	0,01%
UV-Objektiv	55,00%	60,00%
Verwendete Filter vor Detektor	15,00%	80,00%
Quantenausbeute H6240	13,00%	14,00%
detektierbare Leistung	0,000000003%	0,00000081%

Tab. 5: Transmission entscheidender optischer Komponenten im UV-Bereich. Die Werte repräsentieren typische Meßwerte, die bei der Justage des Systems erreicht wurden. * Abschätzung der Transmission nach [Novotny, 1996].

Die relativen Transmissionswerte, die typischerweise bei der Justage des Systems erreicht wurden, und die Quantenausbeute des Single Photon Counters sind in Tab. 5 dargestellt.

Wie aus der Tab. 5 hervorgeht, liegt die Schwachstelle der UV-Tauglichkeit des Systems in der Faser, aus welcher die Sonden hergestellt werden. Bei 305nm konnte am Ende einer 0,3m langen Faser dieser Sorte nicht mehr als 0,03% von der Eingangsleistung gemessen werden, die mit Hilfe des Splices in die Faser eingekoppelt wurde. Die Verluste der Kopplung im Splice liegen erfahrungsgemäß, je nach Qualität der Faserenden, bei unter 20%, so daß der geringe Durchgang auf Absorptionsverluste in der Faser zurückzuführen ist. Die Verluste in der Faser machen sich auch dadurch bemerkbar, daß in der Faser Fluoreszenzlicht erzeugt wird. Ein Teil des Fluoreszenzlichtes wird für das Auge sichtbar nach außen hin abgestrahlt.

Die detektierte Leistung ist bezogen auf die Eingangsleistung um 9 beziehungsweise 7 Potenzen geringer (siehe Tab. 5). Bei einer Eingangsleistung von 100µW und einer Wellenlänge von 305nm kann vom Detektor nach dieser Betrachtung noch $3 \cdot 10^{-13}$ W gemessen werden. Diese Leistung entspricht einer Zählrate von 452489 Photonen pro Sekunde. Bei einer typischen Rastergeschwindigkeit von 3 Sekunden pro Zeile (1/3Hz) und 200 Pixeln pro Zeile können 7089 Photonen pro Pixel detektiert werden. Die gleiche Betrachtung für 351nm führt zu einer Zählrate von 2139084 Photonen pro Pixel. Das Rauschen eines Single Photon Counters wird durch die Anzahl der gezählten Photonen bestimmt. Das statistische Rauschen Ra ergibt sich aus :

$$Ra = \frac{\sqrt{n}}{n} \quad (3)$$

[Hamamatsu, 1996].

N bezeichnet hier die Anzahl der gezählten Photonen. Setzt man die errechneten Photonenanzahlen in die obige Gleichung ein, so ergeben sich $Ra_{305nm}=1,2\%$ und $Ra_{351nm}=0,06\%$. Die Voraussetzungen für eine rauscharme Abbildung sind damit trotz der schlechten Transmission der Fasersonde gegeben.

In den folgenden Kapiteln werden nun Messungen mit dem NFOM präsentiert, die zum einen die UV-Tauglichkeit des Systems, zum anderen das potentielle Auflösungsvermögen zeigen sollen, welches mit den verwendeten Sonden möglich ist.

5.1.2 Testmessung an Aluminiumstrukturen

Eine Standardprobe bestehend aus 30-40nm hohen Aluminiumstrukturen auf Glas wurde mit dem NFOM untersucht, um eine Aussage zum Auflösungsvermögen in der Transmission geben zu können.

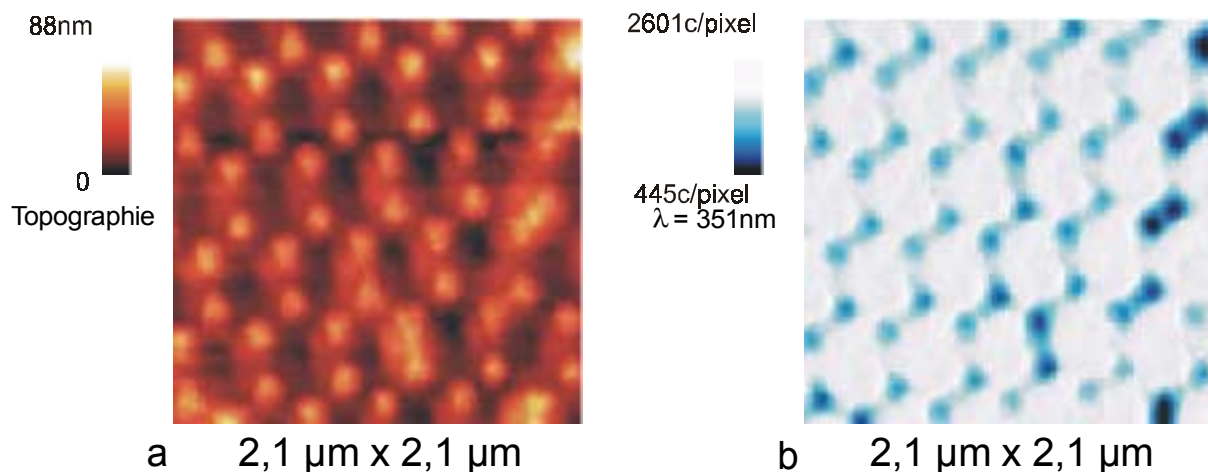


Abb. 18: Standardprobe. Aluminiumstrukturen auf Glasträger. a) Topographie, b) Transmission bei 351nm.

Die Messung, die in Abb. 18 dargestellt ist, zeigt die Aluminiuminseln in der Topographie deutlich. Die Transmission wird im Zentrum der Inseln um ca. 65% vermindert. Die optische Auflösung der Messung liegt im Bereich von 100nm, wie anhand der Halbwertsbreite an den Strukturen gemessen wurde.

5.1.3 Testmessung an Titandioxidpartikeln

Da die vorher gezeigte Teststruktur für tiefere Wellenlänge nicht durchgängig ist, wurde ein UVB-Filter mit dem NFOM untersucht. Das Ergebnis dieser Messungen soll zeigen, daß mit dem System auch im UVB-Bereich genügend hohe Signalstärken detektiert werden können. Dafür wurde der partikuläre Lichtfilter

Titandioxid in Epon eingebettet und untersucht. Dieser Lichtfilter besitzt erst im UVB-Bereich absorbierende Wirkung. Die Partikel sollten daher einen Kontrastunterschied bei Verwendung von 305nm im Vergleich zu 351nm zeigen. Die gleiche Stelle wurde in diesem Fall wieder zweimal nacheinander mit diesen beiden Wellenlängen und der gleichen Spitze gemessen. Bei diesen Messungen wurden 100 μ W bei 305nm und 2 μ W bei 351nm in die Fasersonde eingekoppelt.

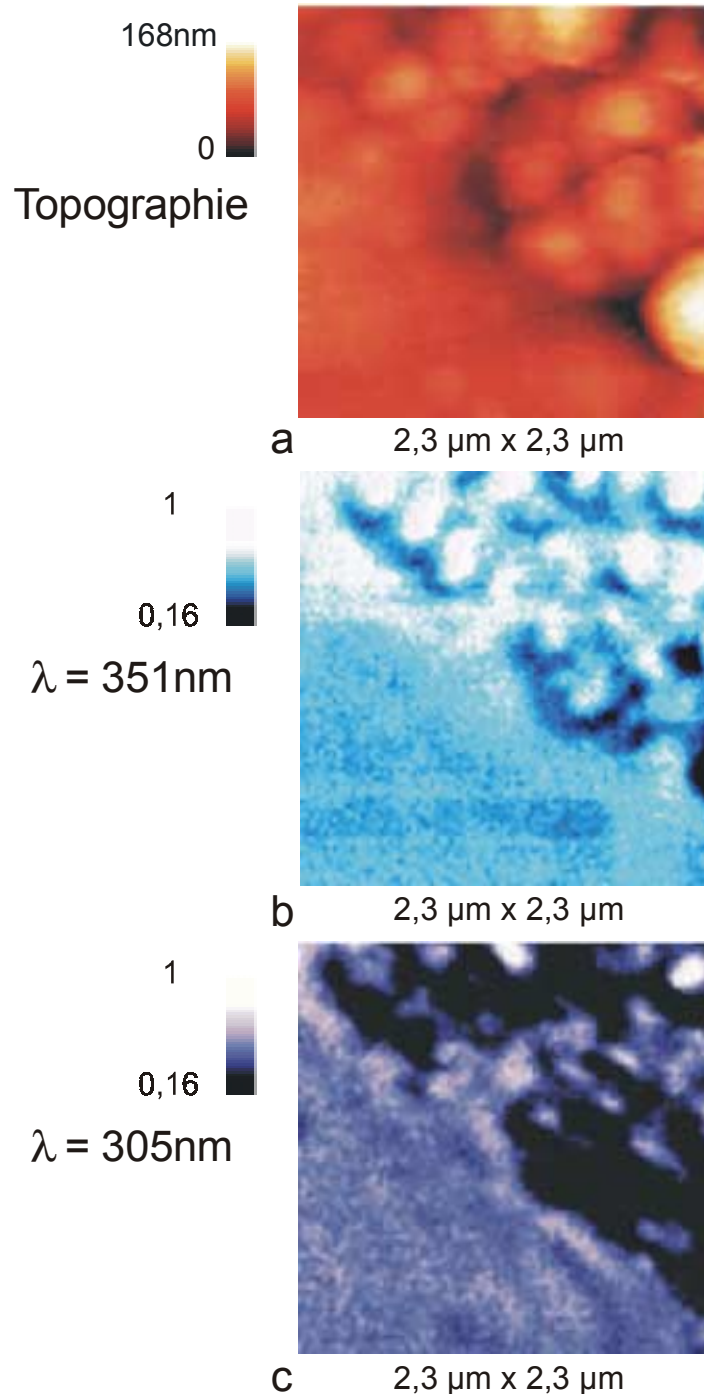


Abb. 19: Titandioxidpartikel in einem 100nm Eponschnitt. a) Topographie, b) Transmission bei 351nm, c) Transmission bei 305nm.

In der Topographie ist zu erkennen, daß in der oberen Hälfte des Bildausschnittes partikuläre Strukturen leicht hervorsteht, die dem Titandioxid zugewiesen werden können.

Das Transmissionsbild bei 351nm zeigt keine deutliche Verringerung der Transmission im Bereich der Titandioxidpartikel, die einer Absorption des UV-Filters zugeschrieben werden kann. Die Transmission erscheint hier im Vergleich zum Eponbereich sehr inhomogen. Dagegen nimmt die Transmission bei 305nm im Bereich des Titandioxids stark ab. Bis auf wenige kleinere Bereiche ist eine Abnahme im gesamten Areal des UV-Filters um über 60% zu verzeichnen.

Das relative Rauschen wurde mittels arithmetischer Rauigkeit im Bereich des Epons zu 3,5% für 351nm und zu 6% für 305nm bestimmt. Die mittlere Zählrate beider Messungen betrug 3398 c/pixel und 1393 c/pixel in diesem Areal, so daß für das statistische Rauschen 1,7% und 2,7% nach obiger Gleichung errechnet werden kann. Der theoretische Wert liegt damit um den Faktor 2 niedriger als der Wert, welcher in dieser Messung ermittelt wurde.

5.1.4 Sensitivität des Systems bei Fluoreszenzmessungen

In diesem Kapitel wird die Sensitivität des Systems bei Fluoreszenzmessung betrachtet. Da das Fluoreszenzlicht einer Probe in alle Raumrichtungen emittiert wird, kann nur ein geringer Prozentsatz durch ein Objektiv gesammelt werden. Für die Fluoreszenzmessungen wurde ein Öobjektiv mit $NA=1,3$ eingesetzt, welches eine Sammeleffizienz von 25% bezogen auf den vollen Raumwinkel besitzt. Die Quantenausbeute des Single Photon Counters beträgt bei Wellenlängen über 500nm ca. 6%. Zusätzlich treten Verluste von 30-40% Prozent durch die Kantenfilter auf, die das Anregungslicht blockieren sollen, so daß nur ca. 0,1% des emittierten Fluoreszenzlichtes bei optimaler Justage des Strahlenganges maximal erfaßt werden kann. Anhand dieser Überlegung läßt sich schon erkennen, daß bei einem Anregungslicht von typischerweise einigen Nanowatt, welches bei einer Einkopplung von 100µW noch durch die Sondenapertur gelangt, Leistungen unterhalb eines Pikowatts detektiert werden müssen.

Um eine praxisbezogene Abschätzung über die Empfindlichkeit des Systems und über die Nachweisgrenze für das verwendete Fluorophor treffen zu können, wurde ein Fluoresceinderivat¹⁷ zu 10% in Epon eingerührt. Ein 70nm Dünnschnitt des eingebetteten Fluorophors wurde mit dem NFOM bei einer Eingangsleistung von 100 μ W untersucht. Die Rastergeschwindigkeit betrug 1/6Hz, so daß bei 200 Pixeln eine Integrationszeit von 0,03s für das Sammeln des Fluoreszenzlichtes zur Verfügung stand. Aus Linienprofilen (nicht abgebildet), die im Übergangsbereich zwischen Dünnschnitt und Glasträger aufgenommen wurden, wurde ein Fluoreszenzsignal von 3800 c/pixel ermittelt. Das statistische Rauschen beträgt damit 1,6%. Um mit diesen Meßbedingungen noch ein Bild der Probe zu erzeugen, welches ein 5%-iges Rauschen aufweist, würden 400 c/pixel genügen. Dies bedeutet wiederum, daß auch ein 70nm Dünnschnitt mit 1% des Fluoresceinderivates ein ausreichendes Signal liefern würde. Bei einer Apertur der Sonde von 100nm im Durchmesser und einem zylinderförmigen Volumen mit einer Höhe von 70nm ergibt sich ein bestrahltes Volumen von 549778 nm³. Angenommen 1% dieses Volumens wird durch Moleküle des Fluoresceinderivates eingenommen und alle Moleküle emittieren Fluoreszenzlicht, dann würden ca. 5500 Moleküle für eine Detektion mit dem NFOM bei gegebenen Meßbedingungen ausreichen.

5.2 Messungen an UV-Filtern

In den folgenden Abschnitten werden Messungen an UV-Filtern präsentiert, die auf einem Glasträger aufgebracht wurden oder in Epon eingebettet wurden. Die Messungen an den verschiedenen Lichtfiltersubstanzen wurden durchgeführt, um eine Aussage über Kontrastentstehung, Topographieeinfluß und Nachweisempfindlichkeit von UV-Filtern bei Transmissionsmessungen mit dem NFOM treffen zu können. Die Bilder spiegeln dabei typische Ergebnisse wider, die bei Messungen an UV-Filtern durchgeführt wurden.

¹⁷ Octadecanoylamino fluorescein

5.2.1 Absorption und Nachweisempfindlichkeit eines UVA-Filters

Bei diesem Lichtfilter handelt es sich um einen chemischen UV-Absorber, dessen Wellenlänge maximaler Absorption bei 360nm liegt. Die Substanz bildet nach Aufbringen aus der wässrigen Lösung Agglomerate in einer Größenordnung, die im Mikrometerbereich liegt.

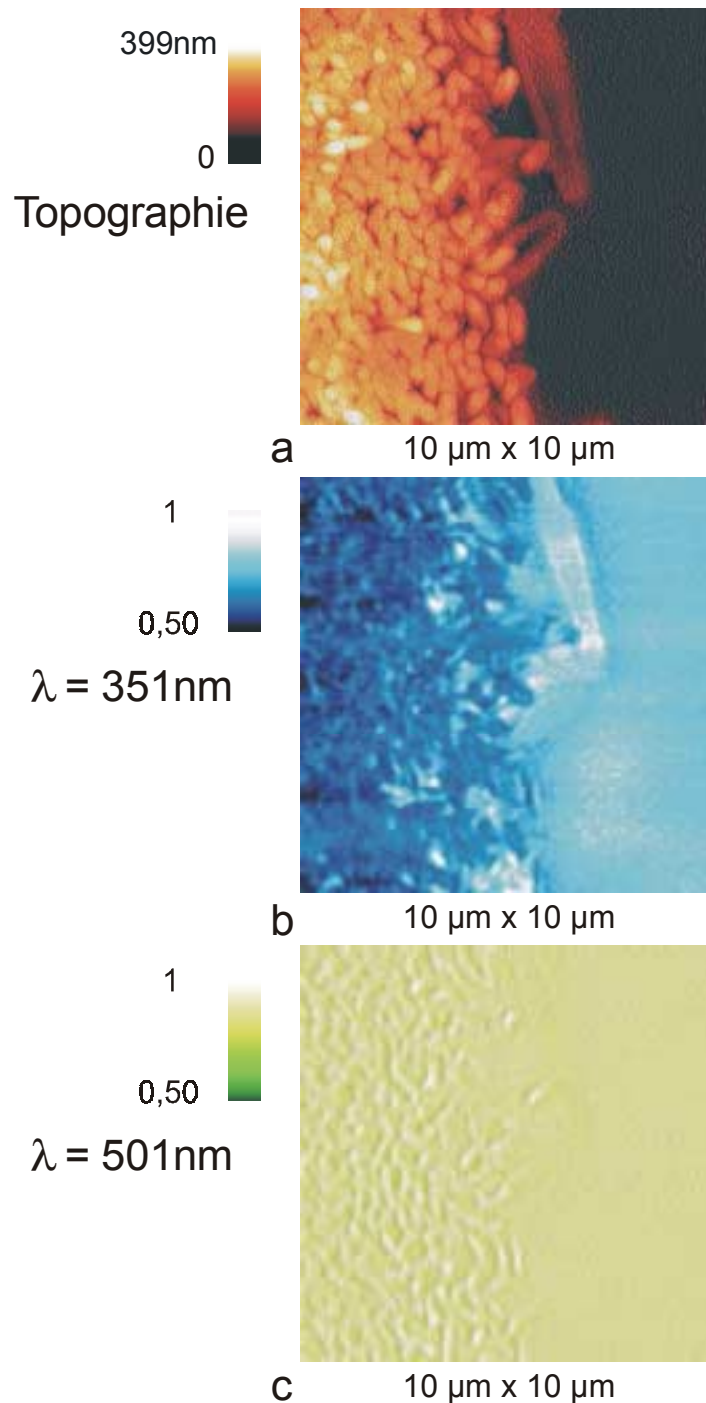


Abb. 20: UVA-Filter auf Glasträger. a) Topographie, b) Transmissionsbild bei 351nm, c) Transmissionsbild der gleichen Stelle bei 501nm.

Es wurde in diesem Fall ein Bereich der Probe untersucht, bei dem der Lichtfilter als auch der Glasträger zu erkennen ist (siehe Abb. 20). Auf der linken Seite der Abbildung befindet sich der Lichtfilter, dessen Schichtdicke im Mittel 200nm beträgt, wie aus der Topographie ermittelt wurde. Es sind einige Lücken zu entdecken, wo weniger oder keine Substanz vorhanden ist. Der Vergleich mit dem Transmissionsbild (351nm) zeigt, daß die Lücken heller erscheinen als die übrigen Bereiche. Relativ zum Glas gesehen wird die Transmission des Lichtes durch den Lichtfilter gemindert. Die Transmission wird genau dort verringert, wo sich die Lichtfiltersubstanz befindet.

Die Messung der gleichen Stelle bei 501nm offenbart dagegen einen anderen Kontrast (Abb. 20c). In dem Transmissionsbild dieser Messung zeigt sich ebenfalls eine ziemlich homogene Transmission im Bereich des Glasträgers. Im Bereich des Lichtfilters ist jedoch keine wesentliche Verringerung der Transmission zu erkennen. Die Transmission erscheint im Vergleich zum Glasträger etwas inhomogen. Es sind dabei leichte Erhöhungen und Verringerungen in der Transmission zu beobachten, die aber mit der Lichtfiltersubstanz nicht korrelieren.

Eine weitere Messung an dieser Probe bei 351nm mit kleinerem Rasterbereich zeigt, daß Strukturen um 200nm im Transmissionsbild aufgelöst werden können (siehe Abb. 21). Die Übereinstimmung von UV-Filtersubstanz in der Topographie und Transmissionsverringern im optischen Bild ist an einigen Stellen gut zu erkennen (siehe Pfeile in Abb. 21).

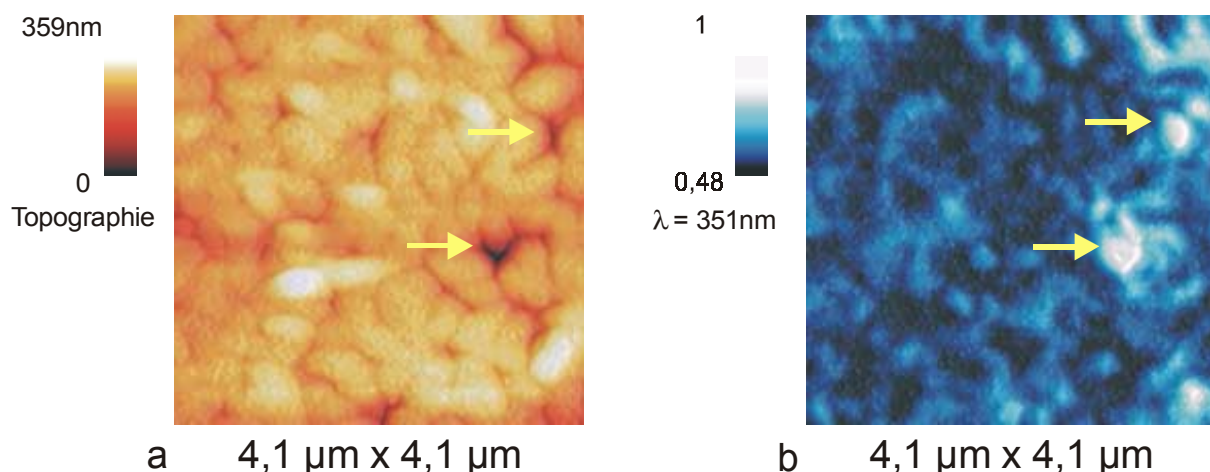


Abb. 21: UVA-Filter auf Glasträger. a) Topographie, b) Transmissionsbild bei 351nm. Die Pfeile markieren Bereiche, in denen die Übereinstimmung fehlender UV-Filtersubstanz und hoher Transmission besonders gut zu erkennen ist.

In einer weiteren Untersuchungen dieses Lichtfilters wurde die Transmission und die Fluoreszenz gleichzeitig gemessen. Die Strukturen, die hier auftreten, sehen etwas anders aus, da es sich um eine höhere Verdünnung des Lichtfilters bei der Präparation gehandelt hat (Abb. 22). Die Bereiche, in denen der Lichtfilter auf dem Glaträger zu erkennen ist, besitzen eine maximale Höhe von ca. 50nm. Die Erhebungen erscheinen relativ glatt und strukturlos in der Topographie. Die Transmission wird in diesen Bereichen um bis zu 35% verringert. Einige kleine runde Strukturen sind auf dem Glaträger in der Topographie zu sehen, die sich teilweise auch in der Transmission widerspiegeln. Die Transmission ist in diesem Bereich inhomogen.

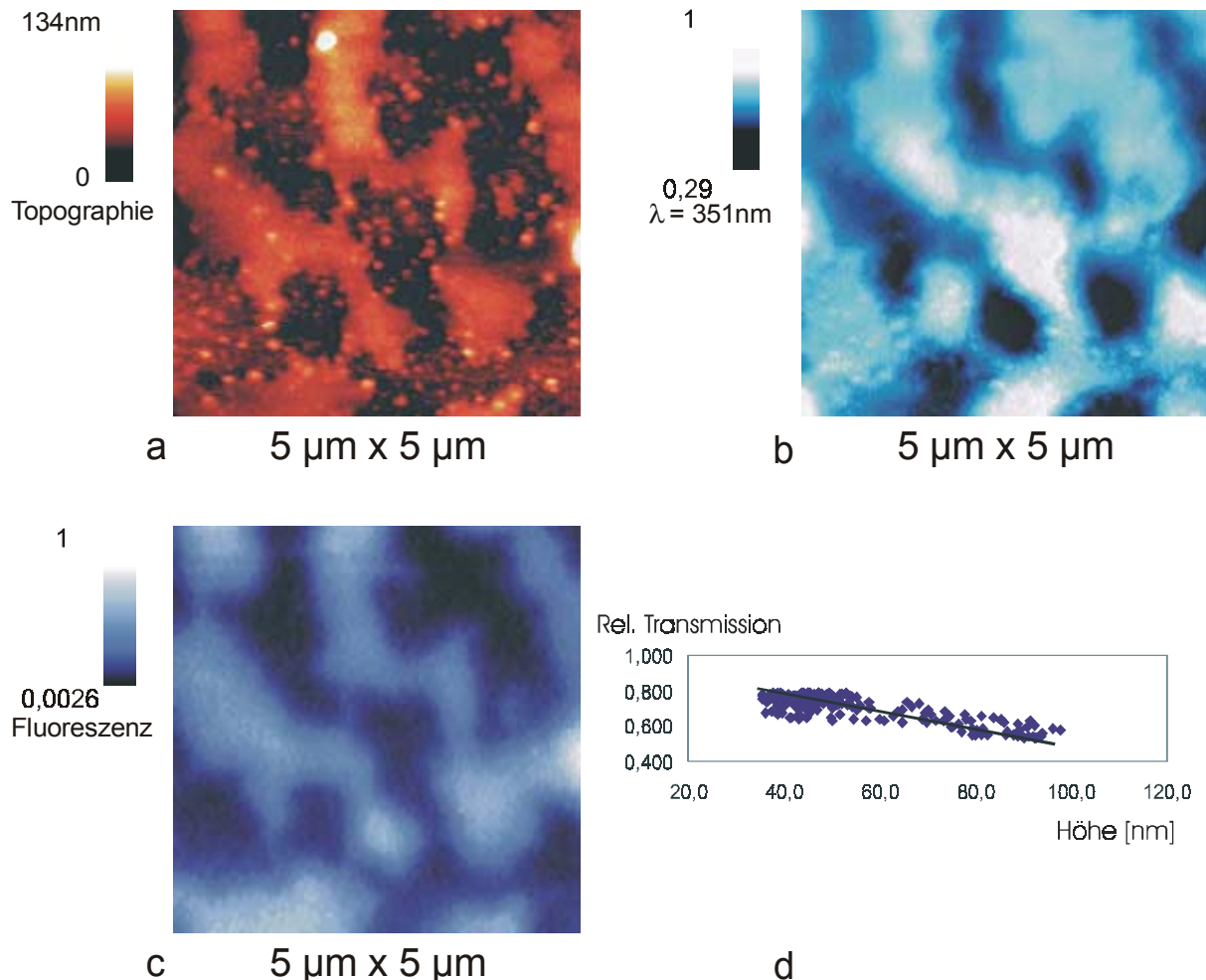


Abb. 22: UVA-Filter auf Glaträger. a) Topographie, b) Transmission bei 351nm, c) Fluoreszenz 400-600nm, d) rel. Transmission eines Linienprofils gegen die Höhen aufgetragen.

Trägt man die relative Transmission gegen die Höhen eines Linienprofils auf, so sieht man einen nahezu linearen Verlauf der Kurve (Abb. 22d). Es wurden 5 Profillinien an verschiedenen Stellen des Bildes Abb. 22b ausgewertet und durch Anpassen einer

linearen Regressionskurve die Steigung der Gerade berechnet. Die mittlere Steigung beträgt dabei 0,0052%/nm. Nimmt man nun an, daß eine 5%-ige Absorption benötigt wird, um diesen Lichtfilter noch vom Glasträger unterscheiden zu können, so müßte die Schichtdicke des reinen UV-Filters nach der berechneten Steigung 9,6nm betragen.

In Abb. 22c ist zusätzlich die Fluoreszenzmessung dargestellt. Für diese Messung wurde ein Breitbandfilter benutzt, welches nur im Bereich von 400nm–600nm lichtdurchlässig ist. Das Fluoreszenzbild zeigt eine Erhöhung der Lichtintensität in den Bereichen des Lichtfilters. Im Gegensatz zum Transmissionsbild erscheinen die kleinen runden Strukturen im Fluoreszenzbild überhaupt nicht. Der Glasträger zeigt nur 0,3% des maximalen Signals und weist keine Inhomogenität auf. Stark absorbierende Bereiche im Transmissionsbild erscheinen im Fluoreszenzbild besonders hell. Eine gute Übereinstimmung von Absorption im Transmissionsbild und Fluoreszenz des UV-Filters ist dabei zu vermerken.

5.2.2 Lichtfilter in Epon eingebettet

Für die konventionelle Präparation von Haut wird in der Regel Epon als Einbettungsmedium benötigt. Da die UV-Absorber nach Applikation auf der Haut nachgewiesen werden sollen, muß getestet werden, ob die Lichtfilter in Epon optisch aktiv sind. Dafür wurden verschiedene Lichtfilter in Epon eingebettet und Dünnschnitte von ca. 200nm hergestellt. Es zeigte sich, daß Parsol1789 und der UVA-Filter keinen optischen Kontrast in Epon liefern. Als Beispiel für einen Lichtfilter, der in Epon lokalisiert werden konnte, werden Messungen an Zinkoxidpartikeln im folgenden Abschnitt vorgestellt.

UV-Filter	Absorption in Epon
UVA (Neoheliopan)	nein
Zinkoxid	ja
Titandioxid	ja
Parso1789	nein
TinosorbM	ja

Tab. 6: Absorptionsverhalten von UV-Filtern in 200nm Epondünnschnitten bei Untersuchungen mit dem NFOM.

Die Abb. 23 zeigt eingebettete Zinkoxidpartikel in Epon. In der Topographie ist zu erkennen, daß eine Ansammlung von Zinkoxidpartikeln aus dem Epon leicht herausragt.

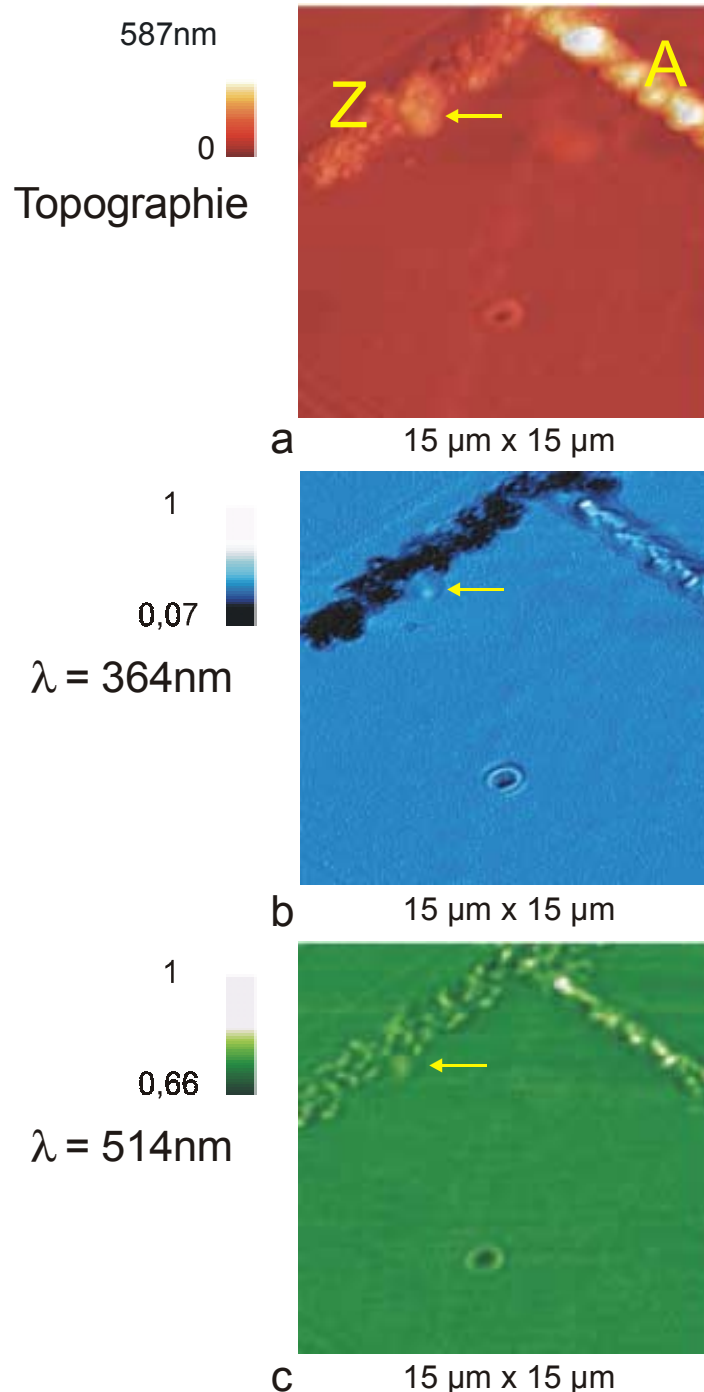


Abb. 23: 200nm Dünnschnitt in Epon eingebetteter Zinkoxidpartikel. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) Transmission bei 514nm. Z = Zinkoxidpartikel, A = Aufwölbung.

Eine etwa 300nm hohe Aufwölbung oder Falte des Dünnschnittes, die wahrscheinlich beim Schneidevorgang erzeugt wurde, verläuft im oberen Bildrand. Ansonsten erscheint die Oberfläche im Bereich des Epons dagegen relativ glatt. Im optischen

Bild ist hier dementsprechend eine homogene Transmission bei 364nm zu sehen (siehe Abb. 23b). Es tritt lediglich eine runde Struktur in der Bildmitte hervor, die sowohl in der Topographie als auch im optischen Bild zu erkennen ist. Hier handelt es sich um eine Vertiefung von 100nm mit leicht aufgewölbtem Rand. Im Transmissionsbild ist zu sehen, daß die Transmission in der Vertiefung leicht abnimmt und auf der Aufwölbung eine Erhöhung der Transmission auftritt.

Im Bereich der Partikel ist eine stark verringerte Transmission zu bemerken. Die Transmission wird dort im Mittel auf 56% reduziert. Die Aufwölbung, die senkrecht zu den Partikeln im rechten Bildrand verläuft, verursacht keine Verringerung der Transmission.

Die gleiche Stelle wurde auch im sichtbaren Bereich bei 514nm untersucht. In Abb. 23c ist das Transmissionsbild dieser Messung dargestellt. Auch hier können Lichtfilter und Epon voneinander getrennt werden. Im Bereich des Lichtfilters wird im Gegensatz zur Messung im UV-Bereich die Transmission nur stellenweise leicht verringert. Es wird ähnlich wie bei den Messungen am UVA-Filter im vorigen Abschnitt teilweise mehr Licht transmittiert als durch das Epon. Ein Partikel im Areal des Lichtfilters erscheint in beiden Messungen transparent (in Abb. 23a durch einen Pfeil markiert). Die Aufwölbung zeigt bei beiden Wellenlängen nahezu identische Strukturen, die sich durch eine Inhomogenität der Transmission auszeichnet.

Ein anderes Areal der Probe wurde mit höherer Auflösung bei 364nm untersucht. Es sind Partikel mit einer Größe von ca. 300-500nm zu finden (Abb. 24). Die Transmission wird von diesen Partikeln verringert. Es ist allerdings zu bemerken, daß zum Zentrum der Partikel hin eine leichte Transmissionserhöhung zu sehen ist. Dies wird besonders in einem Linienprofil durch die Schnittebene eines Partikels deutlich, welches in Abb. 24 dargestellt ist. Im sichtbaren Bereich wird die Transmission des Lichtes im Zentrum einiger Partikel deutlich erhöht. Die Partikel erscheinen außerdem mit einem dunkleren Rand, der eine Halbwertsbreite von ca. 200nm besitzt.

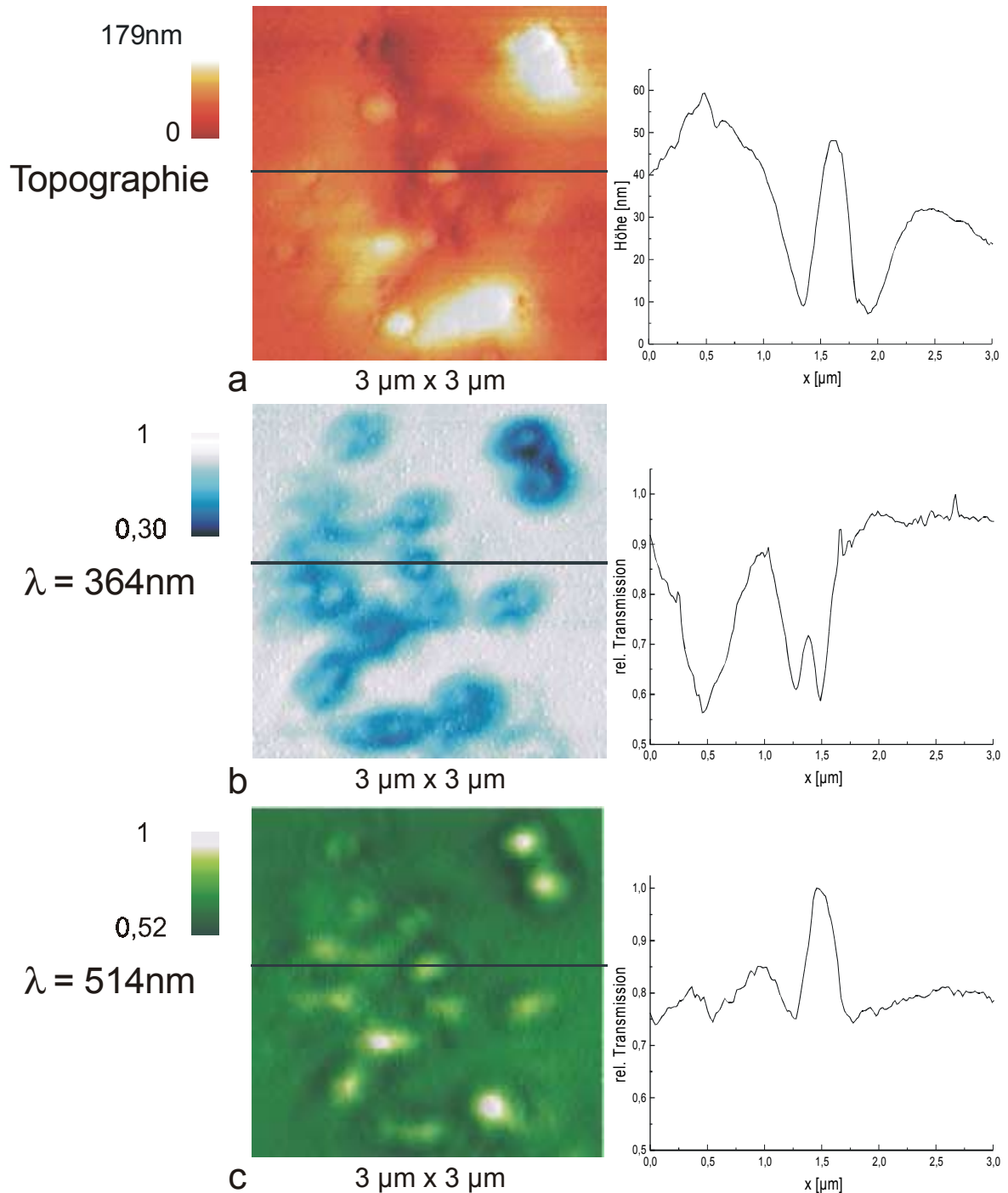


Abb. 24: 200nm Dünnschnitt in Epon eingebetteter Zinkoxidpartikel. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) Transmission bei 514nm und Linienprofile der markierten Bereiche.

5.3 Hautdünnschnitte

5.3.1 Humanhaut

Für die Untersuchungen humaner Haut wurden Dünnschnitte nach konventioneller Präparation hergestellt. Lichtfilterbehandelte als auch unbehandelte Haut wurde

dabei in Epon eingebettet. Die Dünnschnitte wurden zunächst mit dem Lichtmikroskop hinsichtlich eines möglichst glatten Überganges zwischen Einbettungsmedium und Stratum corneum begutachtet.

Unbehandelte Haut

In den lichtmikroskopischen Aufnahmen eines 200nm Dünnschnittes sind die wesentlichen Strukturen der Haut zu erkennen, wie es in Abb. 25 zu sehen ist. Es sind die Zellen der Epidermis mit ihrem Zellkern und Nucleolus zu erkennen. Der Zellkern erscheint heller als das umgebende Cytoplasma der Zelle. Jede Zelle ist von einem hellen Bereich umgeben, in dem sich andeutungsweise Zell-Zellverbindungen abzeichnen. Die einzelnen Zellagen des Stratum corneum sind nicht erkennbar, jedoch hat sich ein Teil des Stratum corneums etwas vom übrigen Teil abgelöst.

Die Zellkerne zeichnen sich in der NFOM-Transmission wie in der Lichtmikroskopie durch eine vergleichsweise homogene Transmission aus. Der Nucleolus wird im Gegensatz zur Lichtmikroskopie nicht abgebildet. Eine dunkle Ablagerung ist auf dem Stratum corneum zu erkennen, die auch in der Lichtmikroskopie abgebildet wurde. Zusätzliche NFOM-Messungen, die in diesem Bereich des Dünnschnittes bei 364nm und 501nm durchgeführt wurden, werden für eine detailliertere Diskussion der Ergebnisse in den nächsten Abschnitten präsentiert.

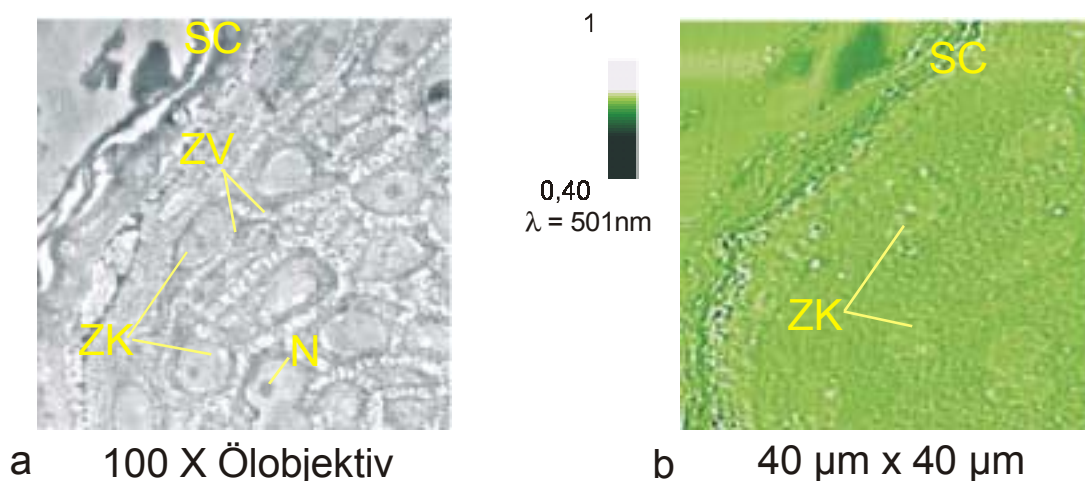


Abb. 25: 200 nm Dünnschnitt konventionell eingebetteter Haut. a) Lichtmikroskopische Aufnahme, b) NFOM-Transmission bei 501nm. ZK = Zellkern, ZV = Zellverbindungen, N = Nucleolus, SC = Stratum corneum.

In der NFOM-Topographie eines 20µm-Ausschnittes zeichnen sich Strukturen ab, die ebenfalls wesentlichen morphologischen Strukturen der Haut entsprechen (Abb. 26).

Das Stratum corneum in der linken oberen Bildecke zeigt mehrere Zellagen, die durch schmale Vertiefungen voneinander getrennt sind. Außerdem sind ansatzweise Zellkerne zu erkennen. Der übrige Teil des Hautquerschnittes erscheint unstrukturiert in der NFOM-Topographie. Die Transmissionsmessungen bei 364nm und bei 501nm zeigen keine signifikanten Unterschiede. In beiden Fällen zeichnen sich ebenfalls schichtartige Strukturen im Stratum corneum und eine relativ homogene Transmission im Bereich der Zellkerne ab. Die Zellagen des Stratum corneums werden dabei durch schmale dunkle Streifen voneinander getrennt.

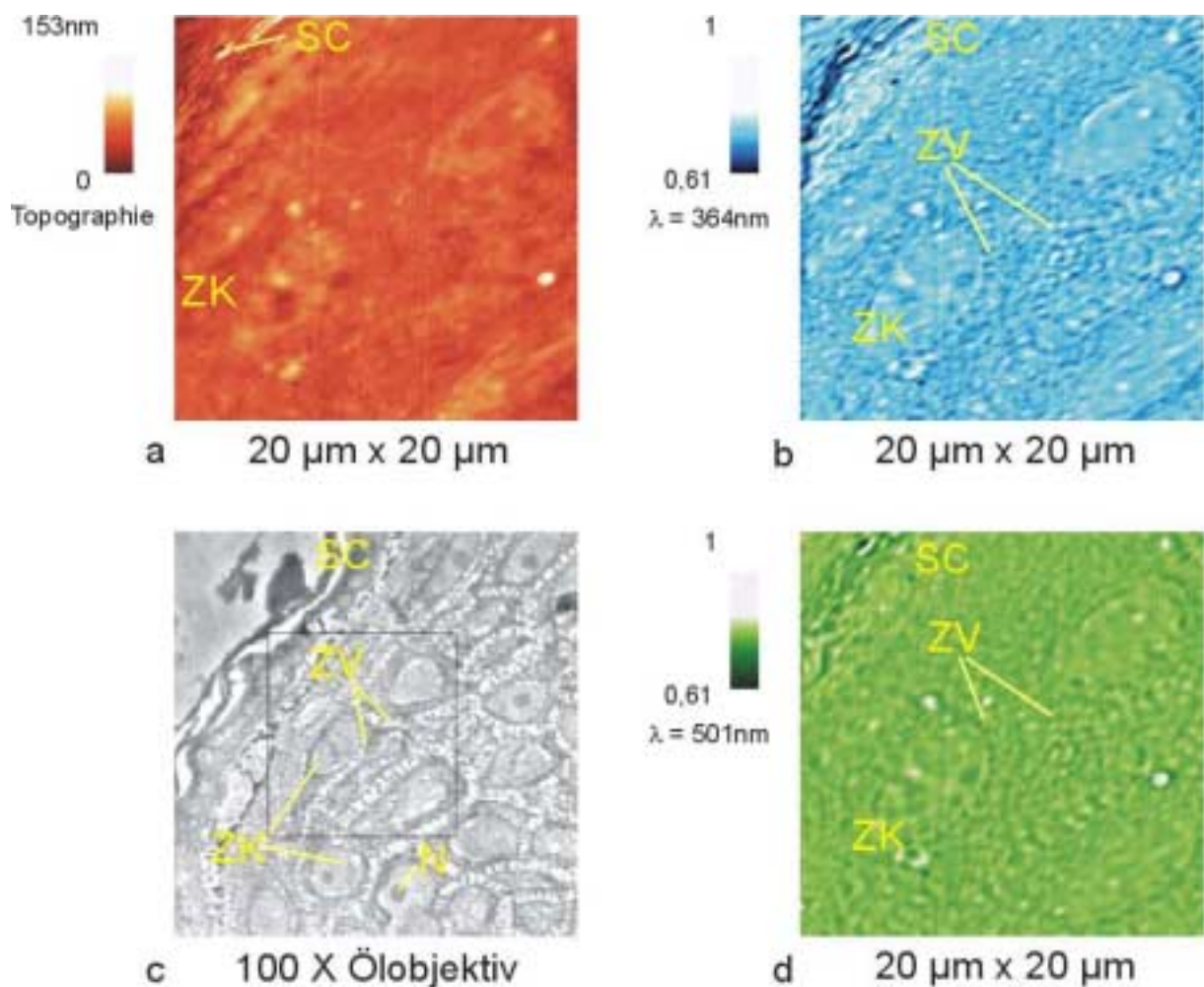


Abb. 26: 200nm Dünnschnitt konventionell eingebetteter Haut. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) lichtmikroskopische Aufnahme an gleicher Stelle des Dünnschnittes, d) Transmission bei 501nm.

Zusätzlich zeichnet sich besonders gut erkennbar in der Abb. 26b eine Struktur ab, welche die einzelnen Zellen umgibt und den Zellverbindungen aus der lichtmikroskopischen Aufnahme ähnelt. Diese Zellverbindungen werden sowohl in der NFOM-Topographie als auch in der AFM-Topographie nicht abgebildet, wie eine AFM-Messung an der gleichen Stelle des Dünnschnittes zeigte (nicht dargestellt).

Im Unterschied zur lichtmikroskopischen Aufnahme sind die einzelnen Lagen des Stratum corneums in den Transmissionsbildern der NFOM-Messung abgebildet. Des Weiteren erscheint das Cytoplasma der Zellen nicht dunkler als die Kerne und zeichnet sich im Gegensatz zur Lichtmikroskopie durch eine inhomogene Transmission aus. Zwischen den Zellen befindliche Verbindungen sind in den NFOM-Messungen ebenfalls durch abwechselnd helle und dunkle Streifen abgebildet.

Die folgenden beiden NFOM-Messungen zeigen die Strukturen des Stratum corneums und einer Zelle des Stratum spinosum noch deutlicher (Abb. 27).

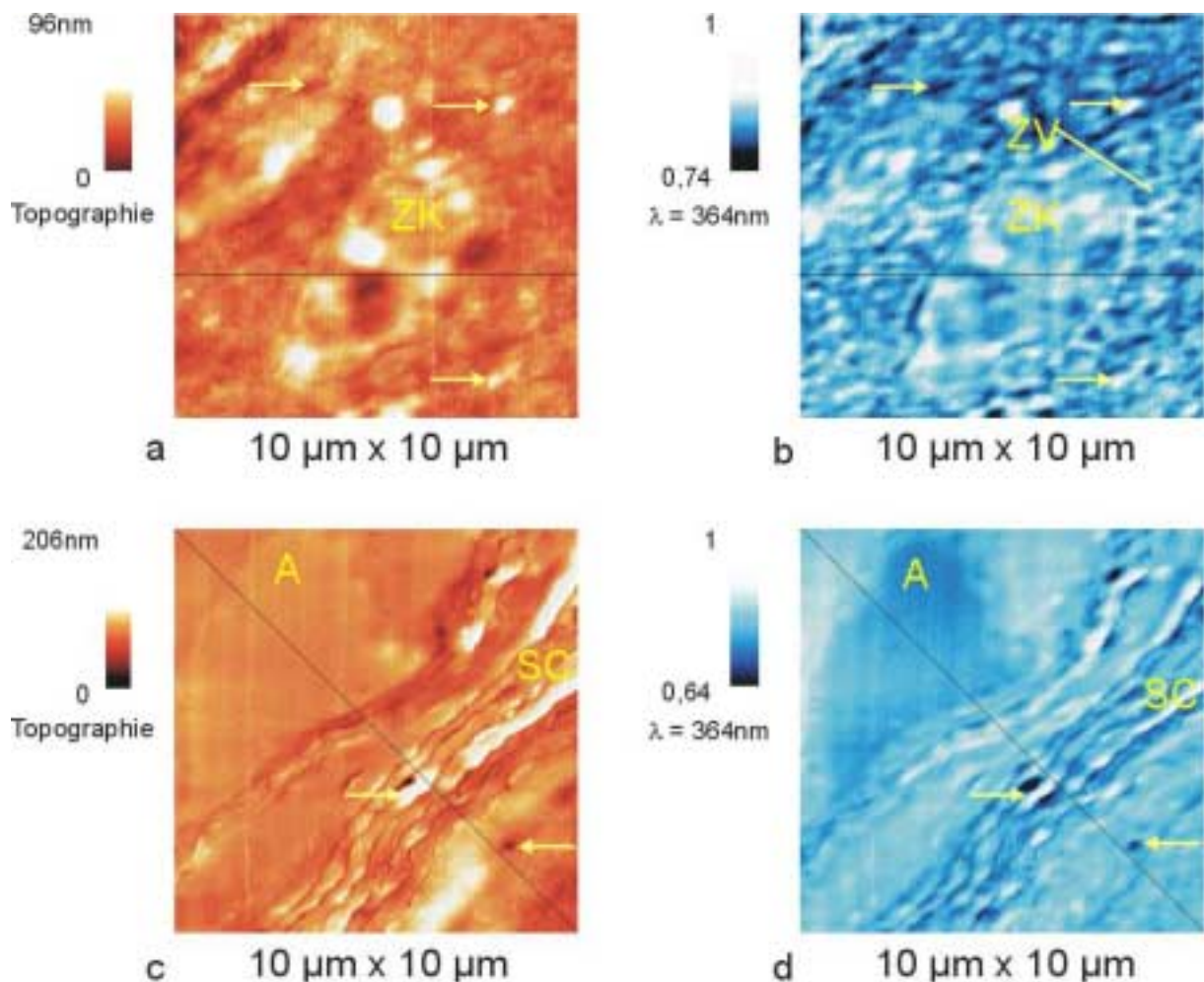


Abb. 27: 200nm Dünnschnitt konventionell eingebetteter Haut. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) Topographie, d) Transmission bei 364nm. Die Pfeile markieren Bereiche, in denen Topographie und Transmission korrelieren. A = Ablagerung, SC = Stratum corneum, ZK = Zellkern.

In Abb. 27a ist ein Zellkern in der Topographie zu sehen, der sich durch eine leichte Erhöhung um 20nm abzeichnet. Es wird weiterhin eine schmale Vertiefung

abgebildet, die diese Erhöhung umschließt. In der Transmission setzt sich der Zellkern dadurch von dem übrigen Bereich ab, daß er homogen das Licht transmittieren läßt. Es sind aber auch hier leichte Transmissionserhöhungen, die mit einer Erhöhung in der Topographie übereinstimmen, und Transmissionsreduktionen zu erkennen, die mit Vertiefungen korrelieren. Dieser Bereich wird durch ein Band von abwechselnd hellen und dunklen Streifen von der ungeordneten Struktur des übrigen Bereiches getrennt. Dieses Streifenmuster (Zellverbindungen) wird auch bei dieser höheren Auflösung in der Topographie nicht abgebildet.

In Abb. 27c ist die Topographie des Dünnschnittes im Bereich des Stratum corneums zu sehen. Am oberen Bildrand befindet sich eine Ablagerung auf dem Stratum corneum, die in der Topographie um einige Nanometer hervorsteht. Diese Ablagerung erscheint in der Transmission um ca. 5% dunkler als das Epon (Abb. 27d). Die einzelnen Corneozytenlagen werden deutlich in der Topographie aufgelöst. In dem Transmissionsbild zeichnet sich ebenfalls der schichtartige Aufbau des Stratum corneums ab. Die ca. 150nm schmalen Vertiefungen sind im optischen Bild als dunkle Streifen zu erkennen, die eine Transmissionsverringering im Mittel von 14% ($\pm 2\%$) relativ zu den Corneozyten in dieser Messung verursachen. Dieser Wert wurde aus 10 Transmissionsprofilen gebildet, die aus der in Abb. 27 gezeigten Messung gewonnen wurden.

Exemplarisch sind Linienprofile für die Topographie und Transmission dargestellt (siehe Markierung in Abb. 27). Diese Profile verdeutlichen die starken Schwankungen der Transmission im Stratum corneum, im Cytoplasma und in den Zellzwischenräumen. Die Profile zeigen auch, daß die Transmission besonders im Stratum corneum mit der Topographie insofern korreliert, daß Vertiefungen in der Transmission dunkler erscheinen (Abb. 28). Die sehr ungeordnete Struktur im Cytoplasma und in den Zellzwischenräumen spiegelt sich in der Topographie nur mit einigen Ausnahmen wider. An einigen Stellen sind aber auch hier wiederum Übereinstimmungen zwischen Probenprofil und Transmission vorhanden (siehe markierte Stellen in Abb. 27).

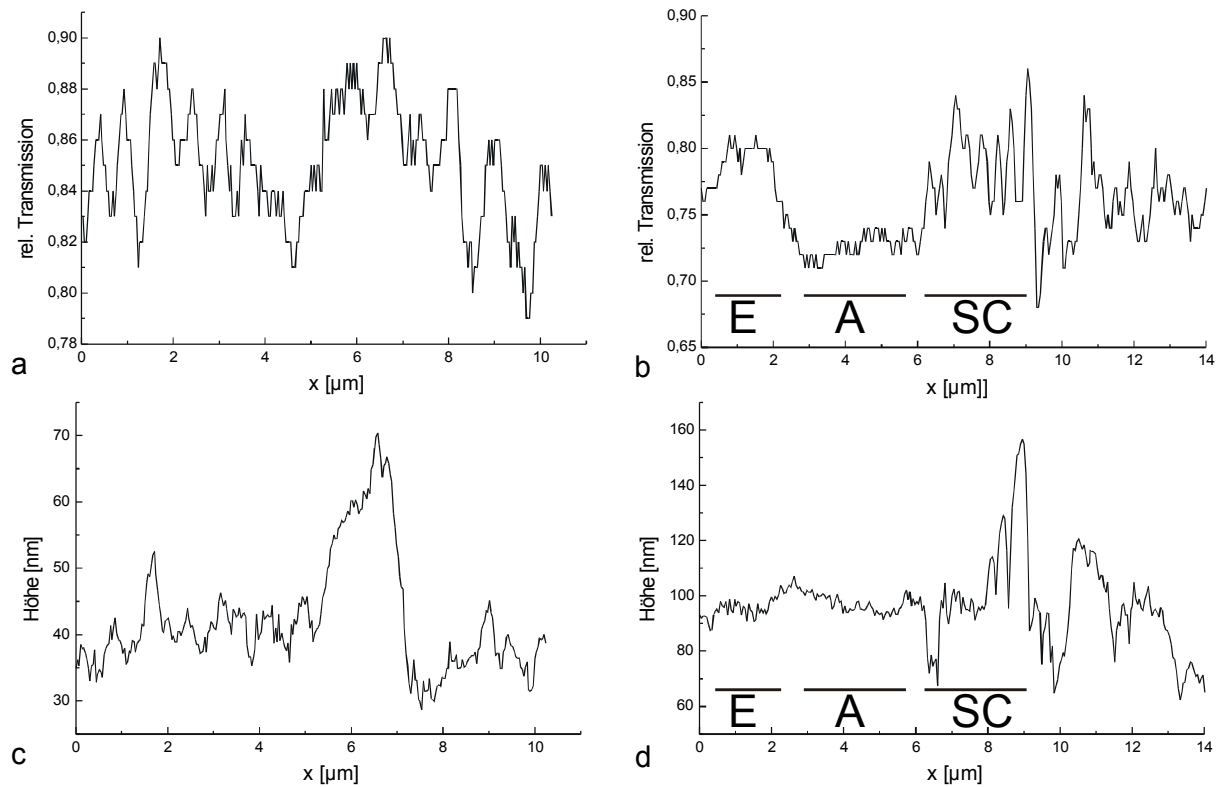


Abb. 28: Linienprofile aus Abb. 27. a) Transmissionsprofil aus Abb. 27b, b) Transmissionsprofil aus Abb. 27d, c) Höhenprofil aus Abb. 27a, d) Höhenprofil aus Abb. 27c. E=Epon, A=Ablagerung, SC=Stratum corneum.

Behandelte Haut

Hautstanzlinge wurden mit verschiedenen Emulsionen behandelt, die Lichtfilter enthielten, und nach 4h Einwirkzeit chemisch fixiert und in Epon eingebettet. Die Untersuchung von Dünnschnitten derartig behandelter Haut ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelter und behandelter Haut.

Bei der behandelten Haut wurden ebenfalls einige Rückstände auf dem Stratum corneum beobachtet, die aber sowohl im UV-Bereich als auch im sichtbaren Bereich absorbieren. Exemplarisch wird eine Messung bei 364nm und 501nm an einem 200nm Hautdünnschnitt gezeigt, welcher Haut nach Applikation von TinosorbM enthält (Abb. 29).

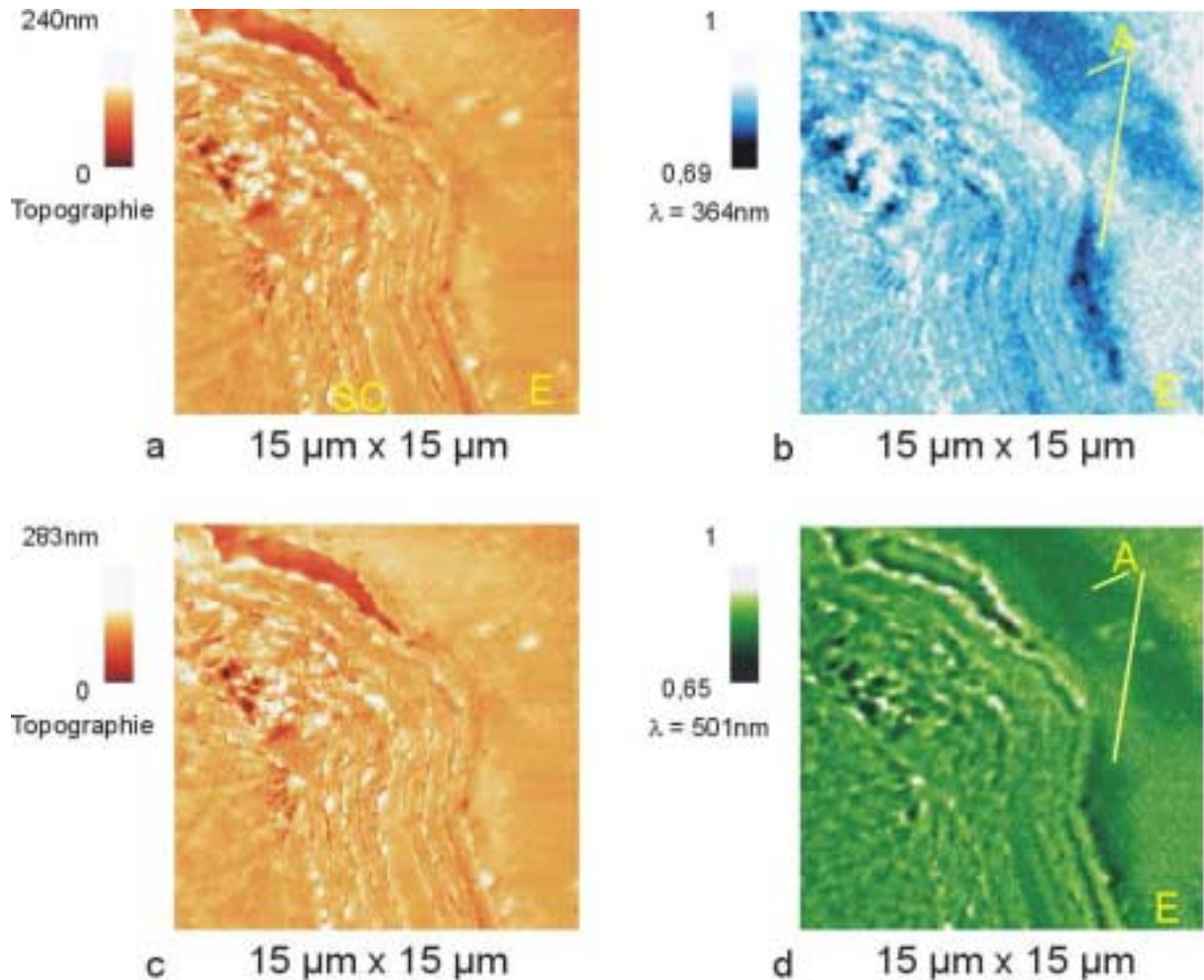


Abb. 29: 200nm Dünnschnitt konventionell eingebetteter Haut nach Auftrag eines UV-Filters. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) Topographie, d) Transmission bei 501nm. SC=Stratum corneum, E=Epon, A=Ablagerung.

Die Strukturen, die in den optischen Bildern zu sehen sind, sind für beide Wellenlängenbereiche nahezu identisch. Auch bei dieser Messung befindet sich eine Ablagerung auf dem Stratum corneum, die allerdings auch hier bei beiden Wellenlängen absorbiert. In den Bildern sind keine Bereiche auffindbar, die bei 364nm stärker die Transmission verringern als bei 501nm, so daß kein Hinweis für die Existenz des Lichtfilters in diesem Querschnitt vorliegt.

5.3.2 Immunmarkierte Haut

In der Lichtmikroskopie ist die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen eine gängige Methode, um einen optischen Kontrast zu erzielen. In diesem Kapitel werden nahfeldoptische Messungen dargestellt, bei denen Hautquerschnitte mittels Immunmarkierung kontrastiert wurden. Dabei wurde das Cytokeratin10 durch ein

Fluorophor, welches bei 518nm sein Emissionsmaximum besitzt, indirekt markiert. Diese Markierung eignet sich hervorragend, um Strukturen der oberen Epidermis darzustellen.

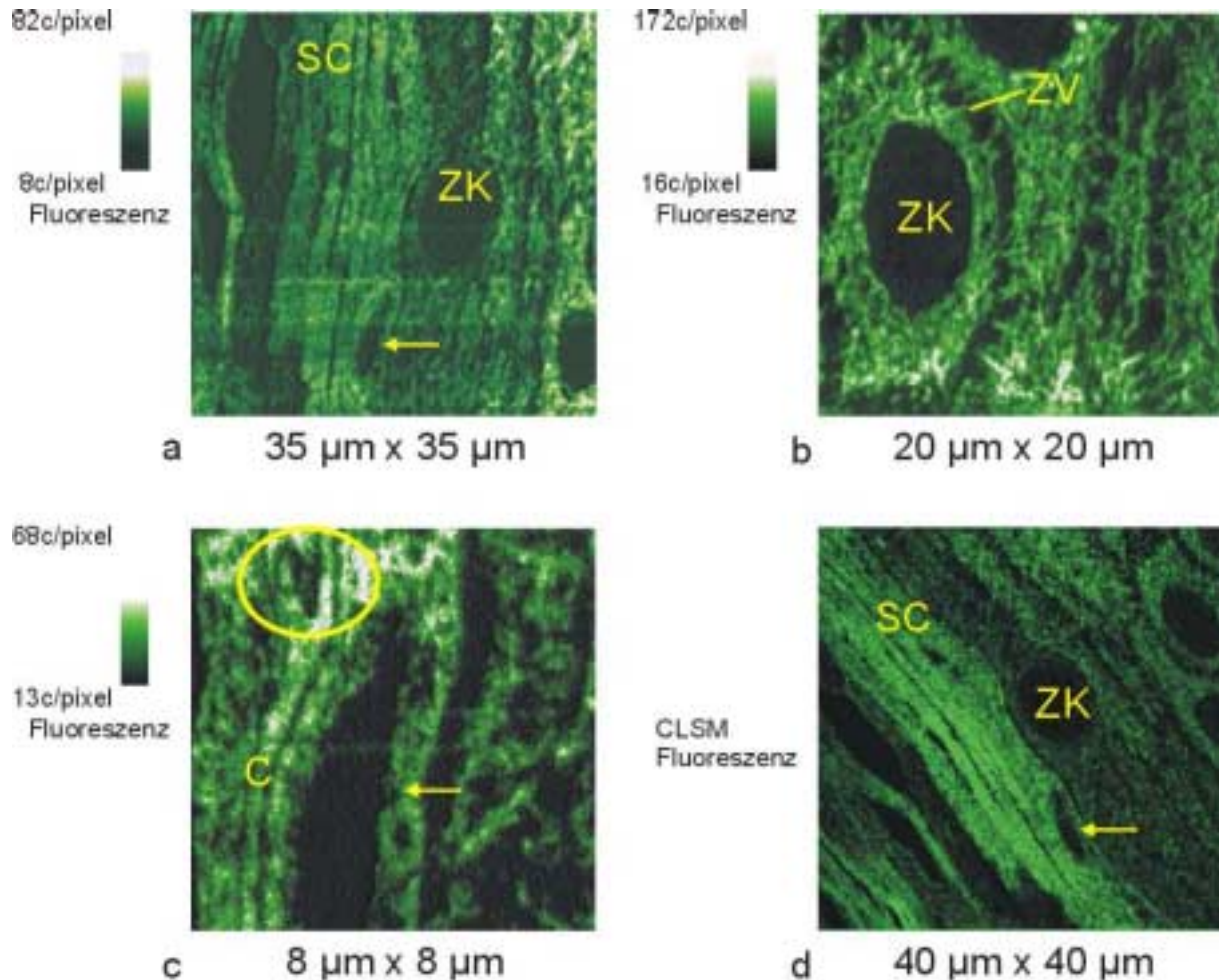


Abb. 30: 200nm Hautdünnschnitt nach Immunmarkierung. Durch die Anfärbung des Cytokeratins erscheinen morphologische Strukturen der oberen Epidermis. a) NFOM-Fluoreszenz, b) NFOM-Fluoreszenz, c)NFOM-Fluoreszenz, d) CLSM-Fluoreszenz. SC=Stratum corneum, ZK=Zellkern, C=Corneozyt, ZV=Zellverbindungen.

In Abb. 30a ist ein Übersichtsbild der Probe zu erkennen. Es sind dabei Stratum corneum und das obere Stratum granulosum zu sehen. Die Zellkerne sind, wie erwartet, nicht angefärbt und zeigen daher keine Fluoreszenz. Der übrige Bereich der Zellen ist dagegen fluoreszierend, wobei allerdings eine inhomogene Verteilung des Farbstoffes zu erkennen ist (Abb. 30b). In dem Bereich zwischen zwei Zellen sind die Zell-Zellverbindungen zu sehen, die mit dem NFOM gut aufgelöst werden können. Im Bereich des Stratum corneums sind die einzelnen abgeflachten Corneozyten zu erkennen. Im Zwischenraum zweier Corneozyten tritt keine Fluoreszenz auf. In Abb. 30c ist ein Teil einer Zelle zu sehen, die sich gerade im Übergang zu einem

Corneozyten befindet. In ihr befindet sich noch ein Zellkern, der nicht angefärbt ist. In diesem Bild ist auch eine Verzahnung zweier nebeneinander liegender Corneozyten im oberen Bildbereich zu beobachten (siehe Markierung). Die dunklen linienförmigen Bereiche zwischen den Corneozyten besitzen in dieser Messung etwa eine Breite von 180nm.

In der Vergleichsmessung mit dem CLSM sind die oben beschriebenen Strukturen ebenfalls gut zu erkennen (Abb. 30d). Bei dieser Messung handelt es sich um den gleichen Bereich der Probe, der zuvor mit dem NFOM untersucht wurde. Ausgebleichte Stellen sind nicht zu bemerken, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die NFOM-Messung kein signifikantes Bleichen mit den eingestellten Parametern verursachte. Die meisten Strukturen können auch in der CLSM-Messung gut aufgelöst werden, jedoch tritt die oben erwähnte Verzahnung der beiden Corneozyten in der NFOM-Messung etwas deutlicher hervor.

5.4 Haardünnschnitte

5.4.1 Melaninpigmente im Haar

Wie in Kapitel 3.4.3 erwähnt, besitzen Haare Pigmente, die lichtstreuende und lichtabsorbierende Wirkung zeigen. Asiatisches Haar ist bekannt dafür, daß diese Pigmente eine besonders hohe Absorption im ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich aufweisen [Leszek, 1987]. In diesem Abschnitt werden Messungen an Dünnschnitten asiatischer Haare gezeigt, bei denen die Kontrastbildung, die durch die Melaninpigmente hervorgerufen wird, im Vordergrund steht.

In der TEM-Aufnahme (Abb. 31) eines Haardünnschnittes sind die wesentlichen morphologischen Regionen eines Haares zu erkennen, die in dieser Arbeit eine wichtige Rolle spielen. Im linken Bildausschnitt befindet sich die Cuticula mit den beiden sich hier deutlich abzeichnenden Regionen, der Endocuticula und Exocuticula, einer einzelnen Cuticulazelle. Im Cortex sind vor allem die ca. 0,3-0,7µm großen dunkel erscheinenden Pigmente gut zu erkennen. Des weiteren können

Umrissse von einzelnen Cortezzellen ausgemacht werden, die sich durch den ZMK voneinander trennen.

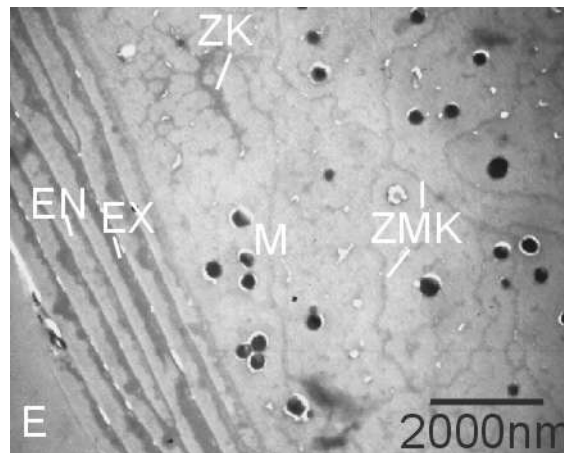


Abb. 31: TEM-Aufnahme eines 50nm Dünnschnittes eines in Epon eingebetteten Haares. Der Dünnschnitt wurde mit Uranylacetat angefärbt. EN=Endocuticula, EX=Exocuticula, E=Epon, M=Melaninpigmente, ZMK=Zellmembrankomplex, ZK=Zellkernrest

In Abb. 32c ist eine Lichtmikroskopieaufnahme eines 200nm dünnen Querschnittes eines asiatischen Haares abgebildet. Es sind kaum Strukturen des Haares in dieser Aufnahme zu erkennen. Bei den dunklen Bereichen handelt es sich aller Voraussicht nach um Melaninpigmente, die das sichtbare Licht absorbieren und streuen. Der gleiche Dünnschnitt wurde auch im NFOM untersucht, um die Kontrastentstehung vergleichen zu können. Der markierte Bereich stellt dabei das im NFOM gemessene Areal dar. In der lichtmikroskopischen Aufnahme erscheinen hier vier als dunkle Spots erkennbare Melaninpigmente.

Eine NFOM-Messung an der gleichen Probe zeigt, daß die Topographie der Probe nicht ideal glatt ist. Es zeigen sich 30-100nm schmale Vertiefungen, die eine netzartige Struktur aufbauen. Außerdem sind im unteren Bereich des Bildes Löcher im Dünnschnitt zu erkennen, die einen Durchmesser von 200-300nm aufweisen. Weiterhin sind runde Erhebungen zu sehen, deren Durchmesser zwischen 300 und 600nm betragen und bis zu 30nm vom übrigen Bereich des Haares hervorstehen (siehe Abb. 32a). Die Verteilung dieser Aufwölbungen läßt die Vermutung zu, daß es sich um die Melaninpigmente handelt, welche in der lichtmikroskopischen Aufnahme dunkel erscheinen.

Das Transmissionsbild der NFOM-Messung bei 501nm ist in Abb. 32b dargestellt. Die Abbildung zeigt eine inhomogene Verteilung der Transmission. In den Bereichen, wo die rißartigen Vertiefungen etwas breiter werden, ist eine geringere Transmission zu verzeichnen. Zudem ist auch eine verringerte Transmission in dem Bereich der beiden Löcher zu erkennen (Markierung). Die Aufwölbungen weisen dagegen in dem Transmissionsbild eine ringförmige Struktur mit hellem Zentrum auf.

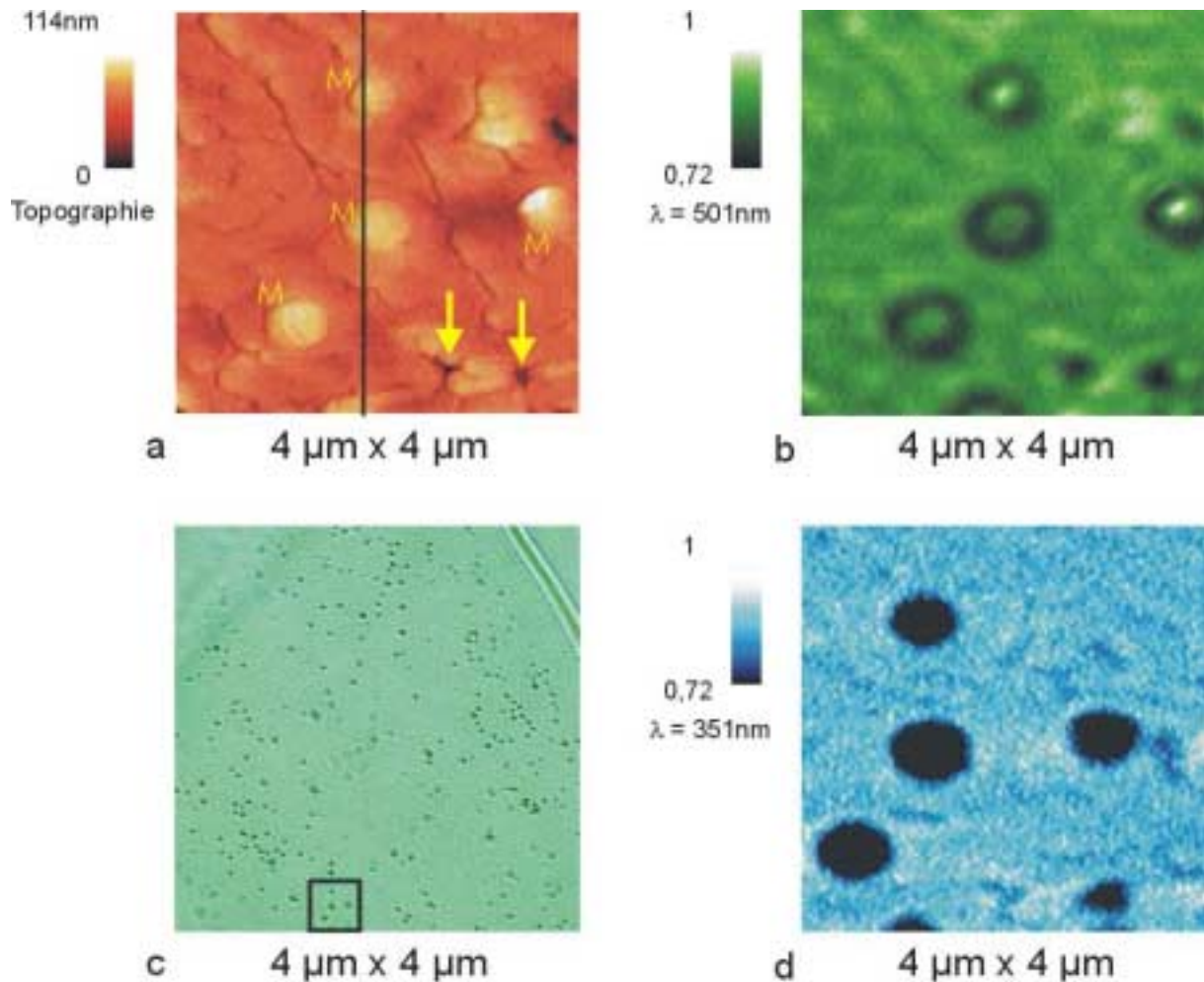


Abb. 32: 200nm Dünnschnitt eines Haares. a) Topographie, die vier Melaninpigmente sind mit einem M bezeichnet worden, die Pfeile markieren Löcher im Haarmaterial, b) Transmission bei 501nm, c) lichtmikroskopische Aufnahme 100XÖlobjektiv, d) Transmission bei 351nm (leicht verschobener Rasterbereich).

Die gleiche Stelle des Haardünnschnittes wurde auch bei 351nm mit der gleichen Sonde untersucht (Abb. 32d). Die Transmissionsmessung zeigt einen völlig anderen Kontrast als die Messung im sichtbaren Bereich. Die Transmission wird bei den Erhebungen deutlich verringert. Im Linienprofil läßt sich erkennen, daß die Transmission ungefähr um 40% hier reduziert wird. Die Löcher erscheinen wie bei der Messung mit 501nm ebenfalls dunkel. Weiterhin ist ein starkes Rauschen im

übrigen Bereich des Haares zu bemerken, welches durch die geringe Lichtleistung verursacht wurde. Die Erhebung im oberen rechten Bildrand zeigt dagegen keine Transmissionsverringering. Das Transmissionsbild im UV-Bereich ähnelt der lichtmikroskopischen Aufnahme mehr als das im sichtbaren Bereich gemessene Transmissionsbild. Die Probe wurde nach der Messung im UV-Bereich wieder im sichtbaren Bereich untersucht. Die wiederholte Messung ergab das identische Verteilungsbild wie in Abb. 32b, so daß der Kontrastunterschied im UV-Bereich nicht durch eine Änderung der Spitzencharakteristik zurückzuführen ist, sondern die reale Lichtabsorption darstellt.

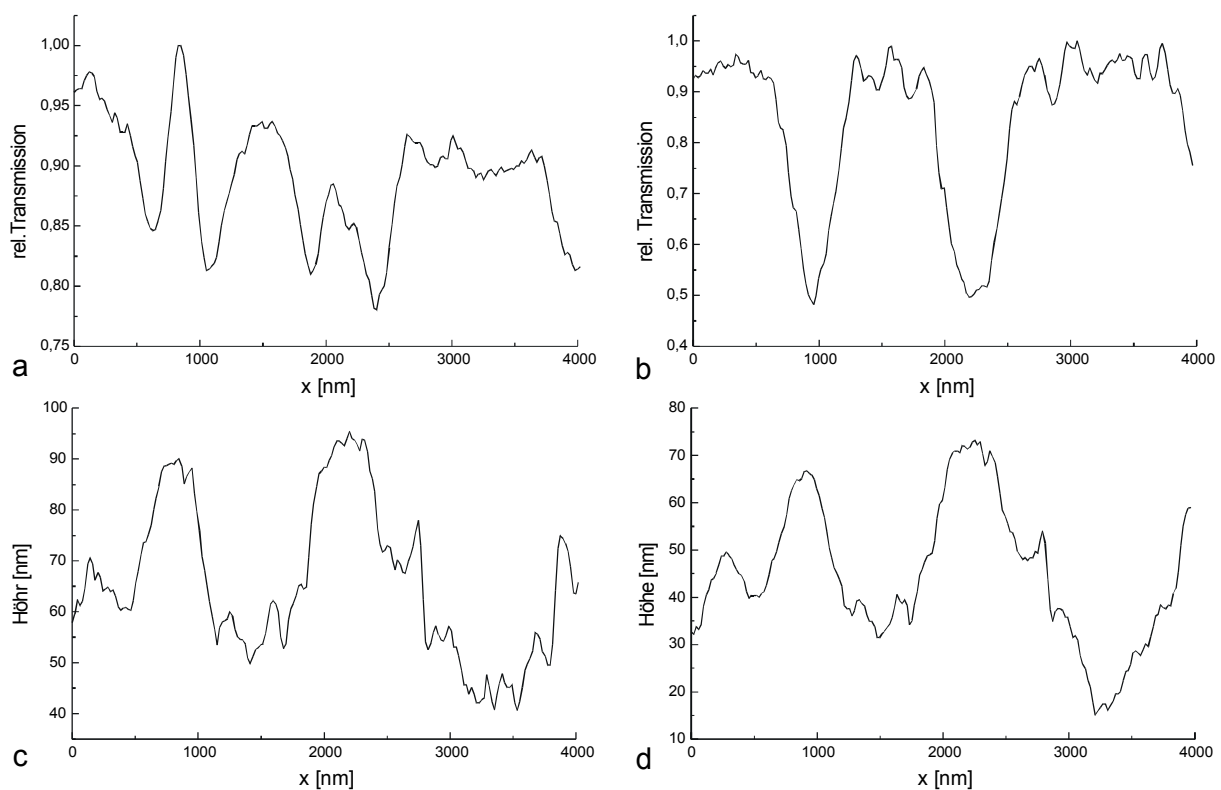


Abb. 33: Linienprofile durch die in angezeigten Bereiche. a) rel. Transmission bei 501nm, b) rel. Transmission bei 351nm, c) Topographieprofil, d) Topographieprofil.

Die vier Pigmente, die sich in diesem Ausschnitt befinden, erscheinen im Gegensatz zur Lichtmikroskopie bei 501nm nicht als dunkle Bereiche. Die Pigmente besitzen einen dunklen Rand mit einem hellen Zentrum. Vor allem bei den zwei oberen Pigmenten kommt dies deutlich zum Vorschein. Hier ist die Transmission im Zentrum der Pigmente sogar höher als im übrigen Bereich des Haares. Ein Linienprofil soll diesen Sachverhalt verdeutlichen (Abb. 33). Die Erhebungen stimmen mit den Transmissionserhöhungen überein. Am Rand der Pigmente wird die Transmission bis zu 15% verringert.

Ein etwas anderes Bild ergibt sich bei der Untersuchung eines weiteren Dünnschnittes im sichtbaren Bereich. Bei diesem 50nm Dünnschnitt wurde eine besonders glatte Oberfläche erzeugt. Es ragen nur einige runde Strukturen leicht aus dem Cortex hervor (Abb. 34a), bei denen es sich aufgrund ihrer Größe und den obigen Betrachtungen nach um Melaninpigmente handelt. Es zeigt sich, daß zumindest einige Pigmente auch im sichtbaren Bereich die Transmission signifikant verringerten (Abb. 34b). Andere Pigmente zeigen aber wieder genau die gleichen Intensitätssteigerungen im Zentrum der Pigmente, wie sie in Abb. 32 zu sehen sind.

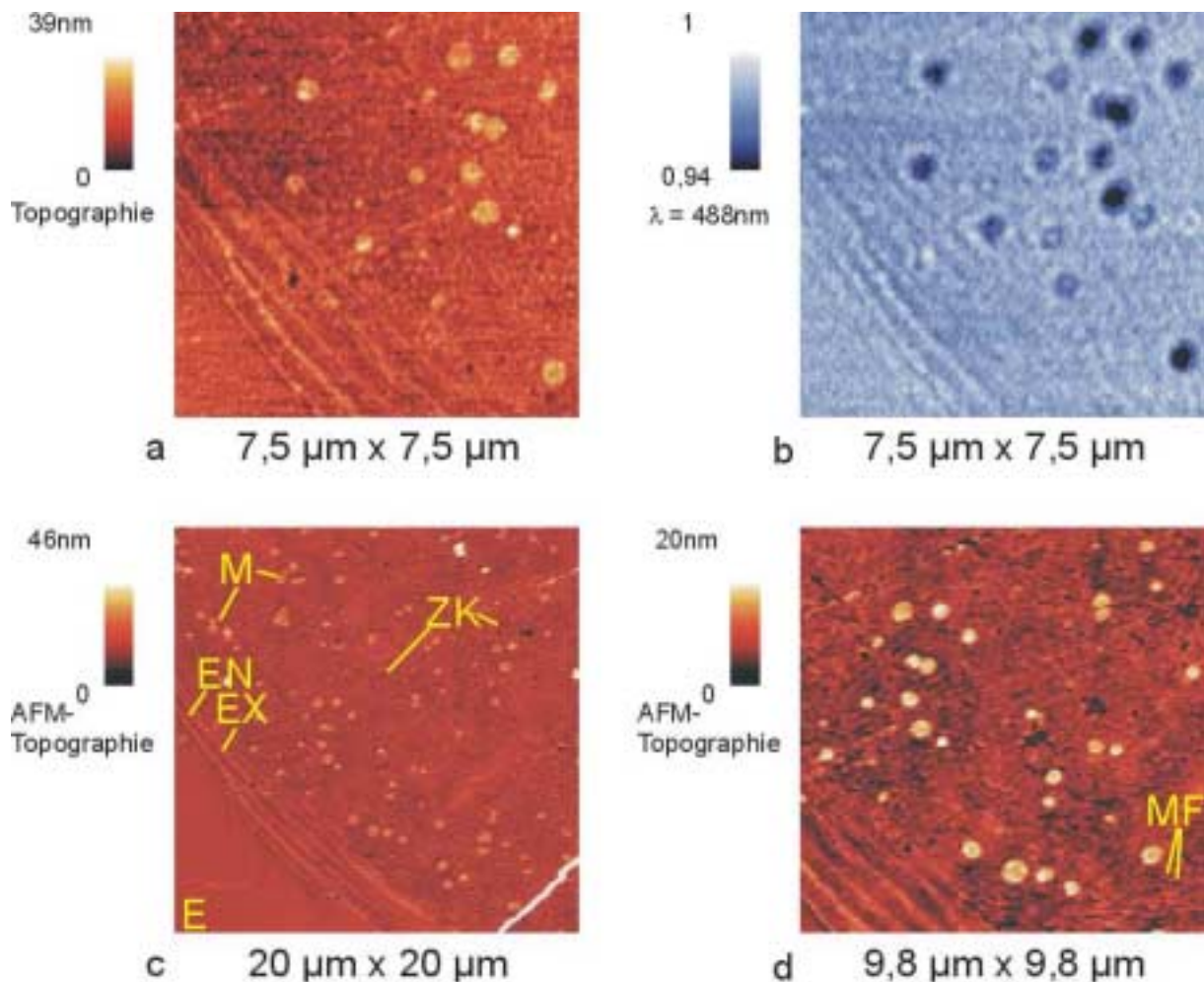


Abb. 34: NFOM-Messung an einem 50nm Dünnschnitt eines asiatischen Haares in Epon eingebettet. a) Topographie, b) Transmission bei 488nm, c) AFM-Topographie der gleichen Probe, d) AFM-Topographie mit erhöhter Auflösung. M=Melaninpigmente, EN=Endocuticula, EX=Exocuticula, ZK=Zellkernrest, MF=Makrofibrillen, E=Epon.

Bei dieser Messung ist auch der Bereich der Cuticula zu sehen, die sich in der Topographie vom Cortex dadurch abhebt, daß abwechselnd Erhöhungen und Vertiefungen länglicher Strukturen vorherrschen. Die Cuticula weist im

Transmissionsbild der NFOM-Messung nur einen leichten Kontrast durch abwechselnd helle und dunklere Bereiche auf.

Eine zusätzlich durchgeführte AFM-Messung an der gleichen Stelle läßt die Strukturen in der Topographie etwas deutlicher als in der NFOM-Topographie erkennen (Abb. 34c,d). Es sind dabei die Umrisse einzelner Cuticulazellen zu sehen. Es heben sich in der AFM-Messung die Pigmente um 10-15nm hervor. Zusätzlich sind runde Strukturen im Cortex zu erkennen, die einen Durchmesser von 200-500nm besitzen und nicht hervorstecken. Diese resultieren aller Wahrscheinlichkeit nach aus dem fibrillenartigen Aufbau der Cortexzellen und zeigen Querschnitte der Makrofibrillen. Des weiteren sind größere Vertiefungen unterschiedlicher Form zu bemerken, die nach Vergleich mit TEM-Aufnahmen und Literaturdaten mit Zellkernresten in den Cortexzellen übereinstimmen.

5.4.2 Penetration eines Fluorophors

Dünnschnitte von Haaren, die zuvor mit einem Fluoresceinderivat eingefärbt wurden (Kapitel 4.3.6), wurden mit dem NFOM untersucht. Um einen Vergleich der abgebildeten Strukturen mit einer etablierten Technik zu erhalten, wurden die gleichen Proben mit dem CLSM untersucht. Die Dünnschnitte zeigen Fluoreszenz im Innern des Haares, wie es in Abb. 35 zu sehen ist.

Die Fluoreszenz stammt dabei eindeutig von dem eingesetzten Farbstoff, da keine Eigenfluoreszenz unter den gegebenen Meßbedingungen im Haarinneren eines unbehandelten Haares auftritt, wie eine Kontrollmessung an einem Dünnschnitt ergab. Diese Kontrollmessung zeigt kein erhöhtes Signal im Bereich des Haares relativ zum umgebenden Epon und wird daher hier nicht dargestellt.

Die Verteilung des Fluoreszenzlichtes ist inhomogen und weist einige besondere Strukturen auf (siehe Abb. 35a). Das Haar wird durch eine ringförmige Struktur umgeben, die den Bereich der Cuticula darstellt. In der hier gezeigten Abbildung ist ein Ausschnitt dieses Ringmusters dargestellt, in dem vier fluoreszierende Linien den Cortex des Haares umgeben. Eine schwache Fluoreszenz kann in weiten Teilen des Cortex beobachtet werden, die nur durch dunkle runde Bereiche unterbrochen

werden, die einen Durchmesser von $0,3-0,7\mu\text{m}$ besitzen. Zudem zeigen sich besonders helle Bereiche mit unbestimmter Form, deren Größe mehrere Mikrometer betragen kann. Des Weiteren ist eine netzartige Struktur zu erkennen, die im gesamten Cortex des Haares zu finden ist.

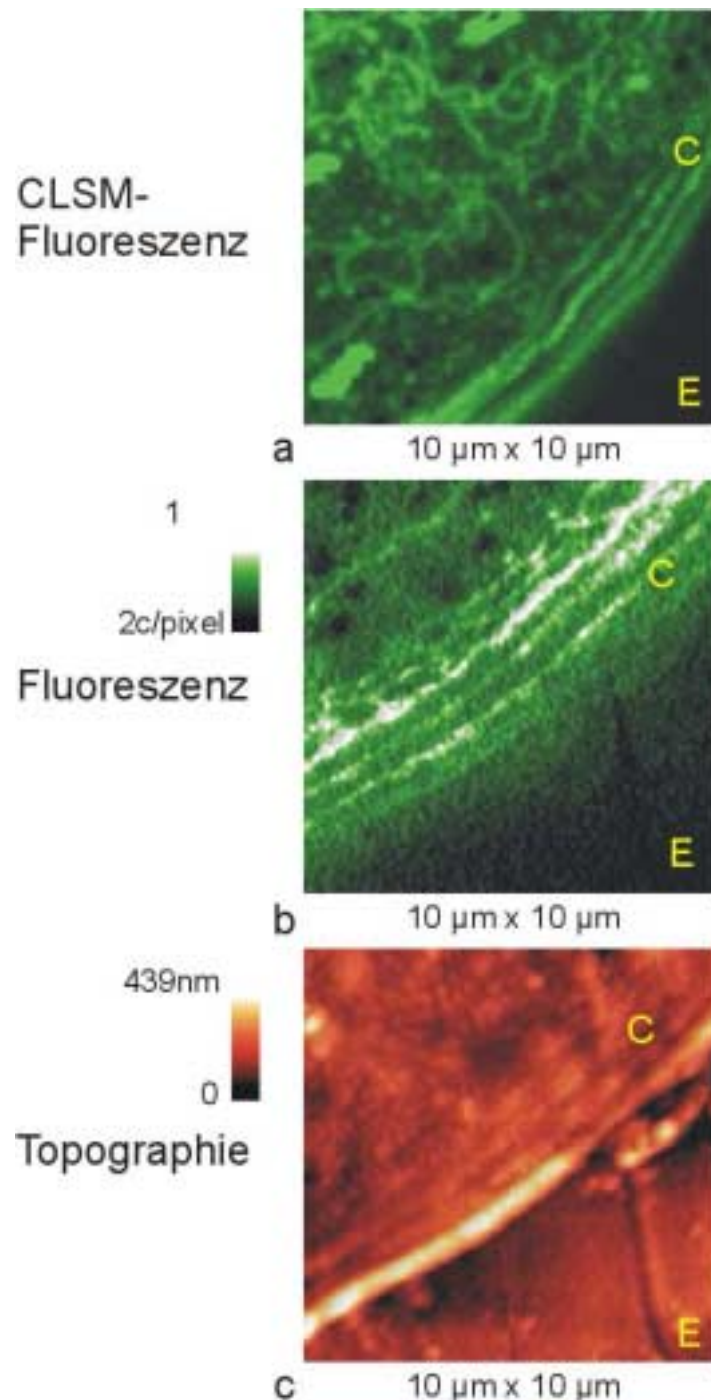


Abb. 35: 50nm Dünnschnitt eines Haares nach Penetration eines Fluoresceinderivates. a) CLSM-Messung, b) NFOM-Fluoreszenz, c) Topographie. C=Cuticula, E=Epon.

Eine NFOM-Messung von einem anderen 50nm Dünnschnitt ist in Abb. 35b dargestellt, die den Übergang zwischen Cuticula und Cortex zeigt. Ähnlich wie bei

der CLSM-Messung erscheint die Cuticula durch ein streifenförmiges Muster. Auch hier ist im Innern des Cortex eine schwache durchgehende Fluoreszenz zu bemerken, die durch dunkle Spots unterbrochen wird. In der Topographie der NFOM-Messung sind derartige Strukturen im Haar erkennbar.

Um einen direkten Vergleich zwischen konfokaler Messung und NFOM-Messung zu erlangen, wurden die gleichen Dünnschnitte untersucht. Eine Messung an der gleichen Stelle eines 200nm Dünnschnittes ist in Abb. 36 abgebildet. Der hier gezeigte Ausschnitt befindet sich im Cortex des Haares. Hier erscheint nochmals die netzförmige Struktur und ein stark fluoreszierender Bereich im Zentrum des Bildes. Die Signalhöhe dieser Struktur ist doppelt so hoch wie die der netzförmigen Struktur.

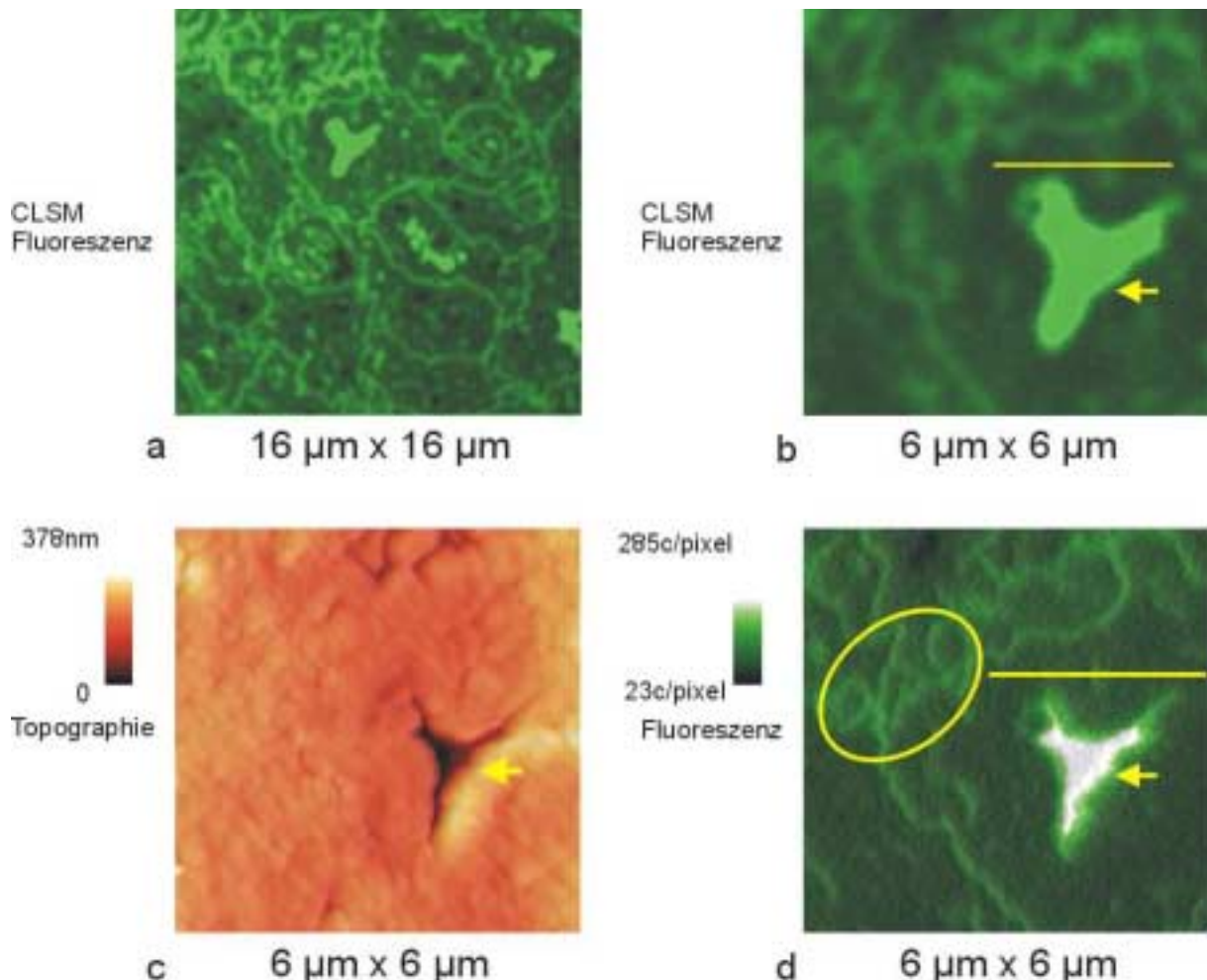


Abb. 36: 200nm Dünnschnitt eines Haares nach Penetration eines Fluoresceinderivates. a) CLSM-Messung, b) Zoom aus a), c) Topographie, d) NFOM-Fluoreszenz an der gleichen Stelle wie in b).

An dieser Stelle wurde vor der CLSM-Messung eine NFOM-Messung durchgeführt, die in Abb. 36a und b dargestellt ist. Der direkte Vergleich beider Bilder zeigt, daß nahezu identische Strukturen bei den Messungen abgebildet wurden. Besonders auffällig ist der in Abb. 36d markierte Bereich, in dem die Netzstruktur so kleine Dimensionen annimmt, daß sie mit dem CLSM kaum noch aufgelöst werden konnte. Dagegen erscheinen diese Strukturen in der NFOM-Messung relativ klar.

Die Topographie weist eine Vertiefung von über 150nm in dem Bereich auf, in dem das Fluoreszenzsignal besonders hoch ist (siehe Pfeil in Abb. 36c,d). Die Form dieser Vertiefung stimmt mit der Form des fluoreszierenden Bereiches gut überein. Ansonsten kann keine Korrelation zwischen Topographie und Fluoreszenzbild in dieser Messung gefunden werden.

Ein Linienprofil durch einen fluoreszierenden Bereich wird in Abb. 37 dargestellt, um das Auflösungsvermögen beider Messungen zu vergleichen. Das Signal einer punktförmigen fluoreszierenden Struktur zeigt bei der CLSM-Messung eine Halbwertsbreite von 240nm und bei der NFOM-Messung eine Halbwertsbreite von 130nm. Dies sind typische Größen von Strukturen, die mit dem NFOM und dem CLSM in der Regel noch aufgelöst werden konnten.

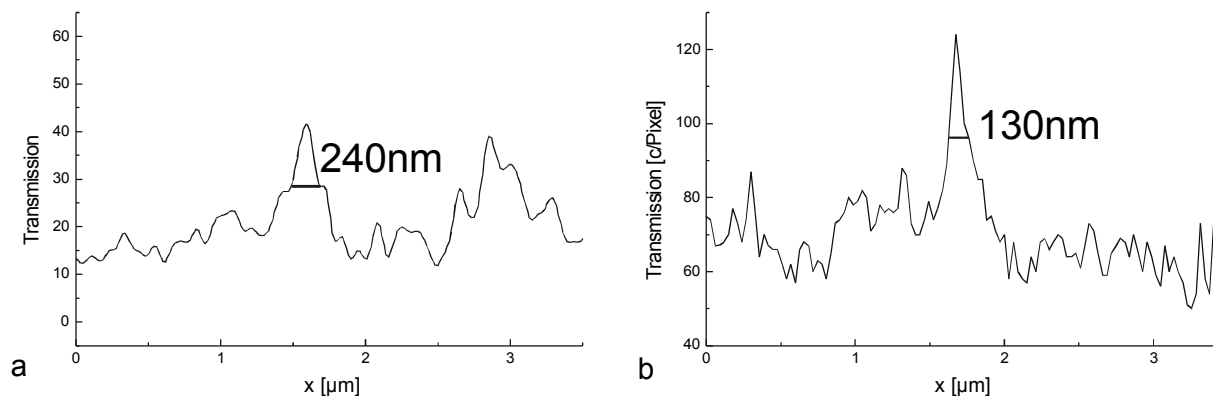


Abb. 37: Linienprofile durch die in Abb. 36 markierten Bereiche. a) CLSM-Messung, b) NFOM-Messung. Die Halbwertsbreiten der Signale einer punktförmigen Struktur wurden zu a) 240nm und b) 130nm bestimmt.

Damit die auftretenden Strukturen besser in Bezug zu morphologischen Regionen des Haares gebracht werden können, wurden zusätzlich Längsschnitte von derartig präparierten Haaren angefertigt und im NFOM untersucht. Eine Messung wird in Abb. 38 dargestellt, die einen guten Überblick des Cortex in Längsrichtung bietet. In dem

Fluoreszenzbild zeigen sich ebenfalls netzartige Strukturen, die allerdings vergleichsweise langgezogen erscheinen. In dem Fluoreszenzbild treten sehr feine Strukturen auf, die eine fransenartige Form aufweisen (siehe Markierung in Abb. 38b).

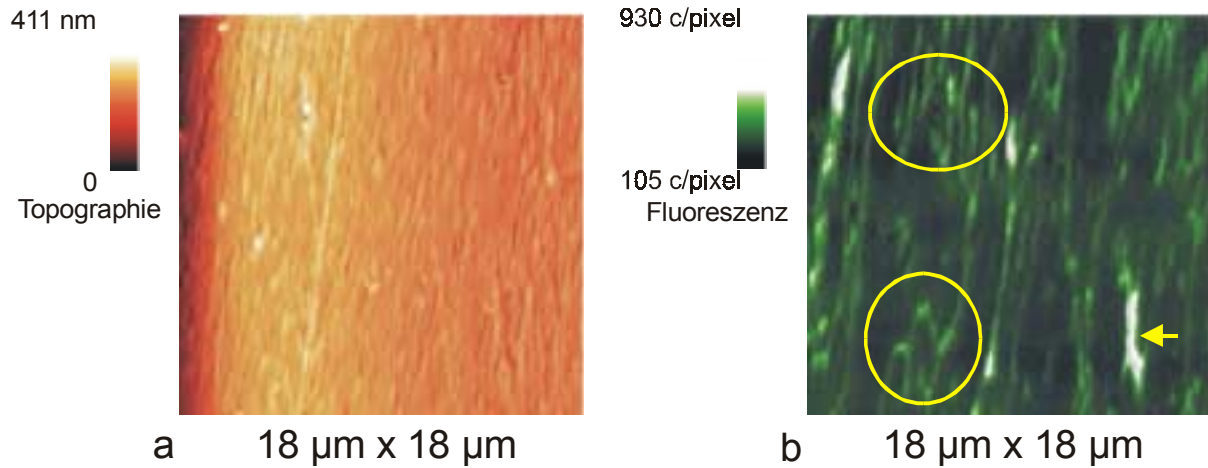


Abb. 38: Längsschnitt eines Haares nach Penetration eines Fluoresceinderivates. a) Topographie, b) NFOM-Fluoreszenz.

6 Diskussion und Schlußfolgerungen

6.1 Apparative Verbesserungen und Testmessungen

6.1.1 UV-Tauglichkeit des NFOM

Die Modifikation des NFOM erwies sich als unumgänglich, um Messungen im tieferen UV-Bereich durchführen zu können. Die Abschätzung für die Transmission der optischen Komponenten im Zusammenspiel mit der Detektionsempfindlichkeit zeigt, daß das abgeänderte System für Wellenlängen im UV-Bereich gut funktioniert. Die gezeigte Testmessung an den Aluminiumstrukturen demonstriert die hohe laterale Auflösung um 100nm, welche auch im UV-Bereich erzielt werden kann. Die Teststrukturen konnten sowohl in der Topographie als auch im optischen Transmissionsbild gut aufgelöst dargestellt werden.

Die Messung an Titandioxidpartikeln bestätigt die Tauglichkeit des NFOM für UV-Messungen auch bei 300nm. Die Ergebnisse zeigen eindeutig einen wellenlängenspezifischen Kontrast im optischen Bild, welcher sehr wahrscheinlich durch das Streuverhalten der Titandioxidpartikel verursacht wird. Das Streuvermögen des Titandioxids hängt von der Partikelgröße und der eingestrahnten Wellenlänge ab (Rayleighstreuung). An Partikeln, deren Durchmesser kleiner als die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes sind, wird kurzwelliges Licht stärker gestreut als Langwelliges. Die Partikelgröße des untersuchten Titandioxids betrug 20nm (Herstellerangaben), wobei aber häufig Agglomerate dieser Partikel mit Durchmessern von bis zu 500nm auftraten. Der Kontrastunterschied zwischen der Messung bei 351nm und 305nm kann daher damit erklärt werden, daß das kurzwelligere Licht sehr viel stärker von den Partikeln gestreut wird. Da Titandioxid ein Halbleiter ist, kann zudem eine reine Absorption von Photonen möglich sein, die Elektronen aus dem Valenzband in das Leitungsband heben können. Der notwendige Energiebetrag wird erst bei der kleineren Wellenlänge aufgebracht, so daß hier zusätzlich die Transmission reduziert wird.

Das gemessene Rauschen ist in den präsentierten Messungen um den Faktor 2 größer als das statistische Rauschen, welches aus der gezählten Photonenanzahl

ermittelt werden kann. Die Ursache liegt wahrscheinlich in dem Einfluß der Topographie. Obwohl der Bereich des Epons gegenüber dem Bereich der Titandioxidpartikel glatt wirkt, sind kleinere Unebenheiten vorhanden, die nur bei genauer Betrachtung erscheinen. Die Topographie kann die Transmission des Lichtes beeinflussen, wie in Kapitel 6.5 noch beschrieben wird. Des weiteren kann das elektronische Rauschen des Signals, welches zur Nachregelung des Abstandes benutzt wird, Abstandsvariationen der Sondenapertur zur Oberfläche hervorrufen. Diese Abstandsänderungen haben zur Folge, daß die Transmission des Lichtes variiert und somit zusätzliche Schwankungen im Signal auftreten können. Dies liegt an der Tatsache, daß der resultierende Photonenfluß aus einer NFOM-Spitze stark abstandsabhängig ist [Novotny, 1996]. Ein weiterer Einfluß auf die Bildqualität stellen möglicherweise auch mechanische Vibrationen dar, die Einfluß auf die Einkoppeloptik und den Faser-Faserkopplers besitzen. Dadurch kann es sein, daß die eingekoppelte Lichtintensität leicht schwankt. Außerdem ist noch zu bedenken, daß das Epon im Volumen inhomogen sein kann. Dadurch können ebenfalls lokale Transmissionsunterschiede herbeigeführt werden.

6.1.2 Fluoreszenzmessungen mit dem NFOM

Anhand einer Messung an einem Epondünnschnitt, in welchem zu 10% ein Fluoresceinderivat eingerührt wurde, wurde die Sensitivität des Mikroskops für Fluoreszenzmessungen abgeschätzt. Die Abschätzung ergab eine Molekülanzahl von 5500, die zur Fluoreszenz beitragen müssen, damit noch eine genügend hohe Signalintensität meßbar ist. Dies ist eine relativ hohe Anzahl im Vergleich zu Systemen, bei denen Licht einzelner Moleküle für eine Detektion ausreicht [Betzig, 1993].

Für eine hohe Signalintensität sind verschiedene Faktoren entscheidend. Die Effizienz der Sammeloptik ist bei abbildenden Systemen mit 0,25 schon sehr hoch und kann nur durch nicht abbildende Systeme, wie Parabolspiegel, wesentlich übertroffen werden. Weiterhin ist die Quantenausbeute eines Photomultipliers im sichtbaren Wellenlängenbereich mit 5%-10% im Vergleich zu einer Avalanche Photodiode (40%) gering. Eine Detektion mit derartiger Photodiode hat aber zwei entscheidende Nachteile gegenüber dem Photomultiplier. Im UV-Bereich wird die

Quantenausbeute sehr viel geringer, so daß dieses System für UV-Messungen nicht mehr geeignet wäre. Zudem ist die photoempfindliche Detektorfläche mit nur einigen hundert Mikrometer so klein, daß eine sehr präzise Strahlengangjustage erforderlich wird. Ein Umbau mit einer Avalanche Photodiode würde eine elektronische Positioniereinheit für den Detektor erforderlich machen, da die Positionskorrektur des Detektors auch noch nach Annäherung der NFOM-Sonde an die Oberfläche möglich sein muß. Aus diesen Gründen wurde auf eine Avalanche Photodiode verzichtet. Des weiteren wurde bei dieser Messung eine relativ geringe Eingangsleistung von $100\mu\text{W}$ gewählt. Diese könnte sicherlich noch um den Faktor 10 erhöht werden, ohne daß die Sonde zerstört würde. Dies würde eine weitere Signalerhöhung nach sich ziehen, hätte aber den Nachteil, daß der Farbstoff schneller ausbleicht. Die Integrationszeit pro Pixel betrug bei dieser Testmessung 0,03s. Aus einer Erhöhung der Integrationszeit würde sich eine Verlängerung der Bildaufnahmezeit ergeben, welche bei 200 Pixeln mit den eingestellten Parametern schon bei 40min liegt.

Die Veränderungen am Mikroskop stellen eindeutig eine Verbesserung des Systems dar, die erst eine erweiterte Einsetzbarkeit des Mikroskops im UV-Bereich ermöglicht. Die Empfindlichkeit ist für Transmissionsmessungen im UV-Bereich und für Fluoreszenzmessungen hoch genug, wie es die dargestellten Ergebnissen aufweisen. Die Anzahl der detektierten Photonen ist dabei in der Regel ausreichend hoch, um Messungen mit einem statistischen Rauschen von weniger als 5% durchzuführen. Eine weitere Verbesserung des Systems stellt die Möglichkeit dar, mit Hilfe eines Beamsamplers gleichzeitig Transmissions- und Fluoreszenzmessungen durchzuführen. Auf diese Option wird im nächsten Kapitel eingegangen, in dem Untersuchungen an dem UVA-Filter diskutiert werden.

6.2 Absorption und Nachweisempfindlichkeit eines UV-Filters

Die Ergebnisse dieser Meßreihe zeigen einen wellenlängenabhängigen Kontrast in der Transmission für 351nm und 501nm. Im sichtbaren Wellenlängenbereich kommt es zur Streuung und zu Topographieeffekten, auf welche detaillierter in Kapitel 6.5 eingegangen wird. Dadurch erscheint der Bereich des Lichtfilters nicht homogen transparent, sondern leicht strukturiert. Die Messungen im UV-Bereich zeigen dagegen eindeutig einen Kontrast, der wesentlich durch die Absorption des Lichtes

durch den UV-Filter hervorgerufen wird. Eine lokale Übereinstimmung von Lichtfiltersubstanz und Transmissionsverringering ist zu bemerken. Durch diesen Kontrastunterschied kann der Lichtfilter auf einem Glaträger durch seine optischen Eigenschaften lokalisiert werden.

Die Anzahl der Moleküle eines UV-Filters, welche benötigt werden, um diesen anhand der wellenlängenspezifischen Absorption vom Glaträgern unterscheiden zu können, hängt in erster Linie von dem Extinktionskoeffizienten ab. Zusätzlich ist aber auch die Apertur der NFOM-Sonde zu berücksichtigen, weil davon das Volumen der Probe abhängt, welches mit dem Licht wechselwirkt.

Im Ergebnisteil wurde die Schichtdicke des UVA-Filters abgeschätzt, welche zu einer 5%-igen Signalverringering beitragen muß. Bei dem verwendeten UV-Filter wurde die Schichtdicke zu ca. 10nm bestimmt. Die lineare Abhängigkeit der Absorption mit der Schichtdicke stimmt mit den theoretischen Berechnungen von Novotny überein, der ebenfalls einen linearen Verlauf mit Hilfe der MMP zwischen Transmission und Schichtdicke eines absorbierenden Materials berechnet hat [Novotny, 1996]. Bei einer Spitzenapertur von 150nm im Durchmesser und einer Schichtdicke von 10nm ruft ein Volumen von 169646 nm^3 eine genügend hohe Absorption hervor. Nimmt man ein Volumen eines Moleküls von ca. 1 nm^3 an, so müssen ca. 170000 Moleküle zur Absorption beitragen. Für die Abschätzung wurde ein Aperturdurchmesser von 150nm angenommen, weil die laterale Auflösung bei den Transmissionsmessungen in der Regel zwischen 100nm und 200nm liegt.

Diese Abschätzung ist relativ grob und setzt ein vereinfachtes Modell voraus. Zudem gilt sie nur für diesen UV-Filter mit einem Extinktionskoeffizienten¹⁸ von 0,8. Sie zeigt jedoch die Größenordnung von Molekülen, die bei den NFOM-Untersuchungen zur Absorption beitragen müssen, damit ein genügend hoher Kontrast entsteht.

Wie schon oben erwähnt, hängt die Sensitivität nicht nur vom Extinktionskoeffizienten des Lichtfilters, sondern auch extrem vom Aperturdurchmesser ab. Daher ist es notwendig, Spitzen mit möglichst kleinem Aperturdurchmesser für Transmissionsmessungen zu benutzen. Bei

¹⁸BDF-interne Messung an UVA-Filter (10µg/ml Lichtfilter in 5%-iger NaOH, 1cm Küvettendicke).

Aperturdurchmessern von 50nm ist die Nachweisempfindlichkeit um den Faktor 9 größer als bei dem angenommenen Aperturdurchmesser von 150nm.

6.3 Fluoreszenzmessungen mit UV-Anregung

Im Ergebnisteil wurde eine Fluoreszenzmessung gezeigt, bei der ein UV-Filter mit einer eingestrahlten Wellenlänge von 351nm zur Fluoreszenz angeregt wurde. Es ist dabei zu beachten, daß generell Fluoreszenzmessungen mit einer Anregung im UV-Bereich kritisch zu betrachten sind, weil die meisten Fasersonden eine Eigenfluoreszenz im sichtbaren Bereich besitzen. Dieses von der Faser stammende Fluoreszenzlicht kann sich ebenfalls in der Faser ausbreiten und durch die Spitzenapertur gelangen, so daß dieses Licht zusätzlich detektiert wird. Die Eigenfluoreszenz der Faser ist somit bei dieser Meßanordnung nicht mehr von dem Fluoreszenzlicht zu trennen, welches von der Probe emittiert wird.

Bei der gezeigten Messung kann allerdings davon ausgegangen werden, daß die Kontrastentstehung im optischen Bild durch das Fluoreszenzlicht der Probe generiert wird, weil die Absorption mit der Fluoreszenz genau übereinstimmt und sich eine derartig starke Transmissionserhöhung im Bereich des Lichtfilters durch topographische Einflüsse nicht erklären lassen.

Durch die gleichzeitige Messung der Fluoreszenz und der Transmission kann eine nützliche Zusatzinformation über die Verteilung eines Lichtfilters auf einem Glasträger gewonnen werden. Die Übereinstimmung von Absorptionsbereichen und Fluoreszenzbereichen in den optischen Bildern liefert eine eindeutige Lokalisation der UV-Filtersubstanz auf einem unstrukturierten Untergrund, wie einem Glasträger. Der Vorteil einer gleichzeitigen Messung von Transmission und Fluoreszenz liegt nicht nur in der geringen Zeitdauer, sondern vor allem darin, daß der identische Rasterbereich und somit die identische Topographie für beide optischen Signale zur Bildgebung beiträgt. Dies kann die Interpretation der Abbildungen vereinfachen. Die Option, gleichzeitig Transmissionsmessungen und Fluoreszenzmessungen durchzuführen, stellt damit eine Verbesserung des Mikroskops dar.

6.4 UV-Filter in Epon

Die Gründe dafür, daß einige UV-Filter in Epondünnschnitten keinen Kontrast im NFOM zeigen, können sehr unterschiedlich sein. Es kann daran liegen, daß die Lichtfilter mit Epon vernetzen und damit die optische Aktivität unterdrückt wird. Die in Epon löslichen Filter wurden zu 10% eingerührt. Möglicherweise ist in diesem Fall die Konzentration für eine Detektion zu gering. Höhere Konzentrationen wurden nicht eingesetzt, da diese Proben hinsichtlich der Hautpenetration keinen realen Bezug hätten.

Eingebettete Zinkoxidpartikeln weisen eindeutig einen wellenlängenspezifischen Kontrast im NFOM-Bild auf. Die Partikel können ähnlich wie Titandioxidpartikel Licht reflektieren, streuen und absorbieren. Dabei tritt die Streuung und Reflexion im gesamten Wellenlängenbereich auf. Eine reine Absorption der Strahlung kann nur für Wellenlängen unterhalb von 385nm erfolgen, weil hier die Energie des Lichtes hoch genug ist, um Elektronen vom Valenzband des Halbleiters in das Leitungsband anzuheben [Anderson, 1997]. Die Verringerung der Transmission bei 364nm kann daher durch Absorption und erhöhte Streuung erklärt werden. Der Vergleich der Messungen mit 364nm und 514nm zeigt, daß die Reduktion des Lichtes nicht durch die größere Schichtdicke im Bereich der Zinkoxidpartikel zustande kommt. Dafür spricht auch, daß die Aufwölbung bei beiden Messungen identische Strukturen zeigt und die Transmission dort nicht verringert wird.

Der Kontrast im Transmissionsbild entsteht allerdings nicht nur durch rein optische Eigenschaften der Probe, wie Messungen mit höher Auflösung zeigen. Die leichte Transmissionserhöhung im Zentrum und der dunkle Rand eines Partikels sind keine optischen Eigenschaften des Zinkoxids. Besonders deutlich erscheint dieser Effekt im sichtbaren Wellenlängenbereich, da bei 514nm keine Absorption auftritt.

Die Messungen an UV-Filtern demonstrieren, daß es prinzipiell möglich ist, durch Vergleich zweier Messungen mit unterschiedlichen Wellenlängen spezifisch absorbierende Substanzen mit dem NFOM zu lokalisieren. Da in den vorangegangenen Kapiteln schon auf einige Einflüsse der Topographie aufmerksam gemacht wurde, wird im folgenden Kapitel auf die Kontrastentstehung bei

Transmissionsmessungen eingegangen, um mögliche Erklärungen für die dargestellten Abbildungen zu liefern.

6.5 Kontrastentstehung im NFOM und allgemeine Interpretationen

In diesem Kapitel werden Erläuterungen zur Kontrastentstehung im Transmissionsbild aufgeführt, die für die Interpretation aller erzielten Ergebnisse äußerst wichtig sind. Als Grundlage dieser Erklärungen dienen praktische und theoretische Ergebnisse aus der Literatur. Diese Ergebnisse werden mit den wichtigsten Erkenntnissen aus den Ergebnissen dieser Arbeit in einen Zusammenhang gebracht.

Abstandsabhängigkeit

Wie in [Novotny, 1996] beschrieben, erhöht sich der Photonenfluß durch die Spitzenapertur, wenn sich ein dielektrisches Medium im Nahfeld der Apertur befindet. Die Transmission erhöht sich dann weiterhin mit Verringerung des Abstandes. Die starke Abhängigkeit von Abstand und dem optischen Signal führt dazu, daß eine Änderung von nur 0,1nm im Abstand das optische Signal signifikant verändert [Hecht, 1997].

Eine nahfeldoptische Abbildung besteht daher aus einer Mischung von optischen Eigenschaften und Topographie der Probe [Hecht, 1995][Valle, 1998]. Einige durch die Topographie induzierten Artefakte können dabei dadurch erklärt werden, daß die Wechselwirkungszone des Lichtes trotz Abstandsnachregelung nicht konstant bleibt [Hecht, 1997]. Die Wechselwirkungszone hängt extrem vom Abstand zur Probenoberfläche und zur lateralen Umgebung in der Probe ab. Dies führt zu einer Abbildung, die im wesentlichen durch die Vertikalbewegung der NFOM-Sonde bestimmt wird und dadurch mit der Topographie eng verknüpft ist. Zudem ist die Position die Apertur und die Wechselwirkungszone der Scherkraft nicht unbedingt identisch. Aus der Aluminiumschicht können Körner in der Nähe der Apertur hervorsteigen, die für die wirkenden Scherkräfte und damit für die Topographie verantwortlich sind. Diese Geometrie kann bei strukturierten Proben zu Abstandsänderung führen, die sich letztlich im optischen Signal bemerkbar machen.

Kanteneffekt

Mit einer Änderung des Abstandes läßt sich eine Art Kanteneffekt erklären, der dadurch zustande kommt, daß der Abstand der Spitzenapertur zur Probe sich an steilen Kanten des Probenprofils aufgrund der Spitzengeometrie verändern kann [Martin, 1999]. So führt eine Erhöhung des Abstandes an einer Kante zu einer verringerten Transmission. Bei den abgebildeten Titandioxid-, Zinkoxidpartikeln oder den Melaninpigmenten im Haar kann mit dieser Überlegung der dunkle Rand an den Begrenzungen zum umgebenden Material erklärt werden, weil die Strukturen um einige Nanometer herausragen. Zur Verdeutlichung dieser Überlegung ist in Abb. 39 des erläuterten Sachverhaltes dargestellt.

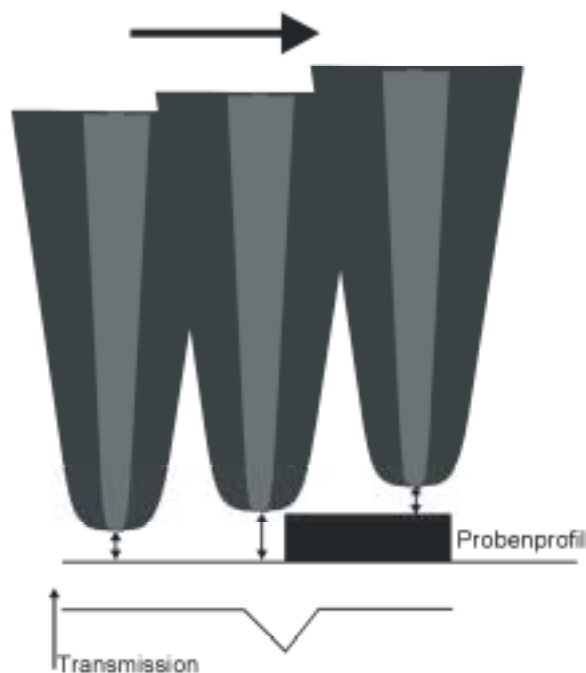


Abb. 39: Schematisch skizzierter Kanteneffekt.

Schmale Vertiefungen

Ähnlich verhält es sich möglicherweise bei schmalen Vertiefungen, die ebenfalls dunkel erscheinen. Dort wird der Abstand der Spitzenapertur aufgrund der Spitzengeometrie wahrscheinlich vergrößert und somit die Transmission verringert. Aufgrund der Metallbedampfung von ca. 100nm besitzen NFOM-Spitzen im Vergleich zu Cantileverspitzen große Spitzenradien, so daß die NFOM-Spitze nicht exakt dem Oberflächenrelief folgen kann. Diese Überlegung würde z.B. die Abbildung von Vertiefungen in den Dünnschnitten von Haut (z.B. im Stratum corneum) und Haaren erklären, die in der Regel dunkler als die Umgebung erscheinen.

Fokussierungseffekt

Gekrümmte Oberflächen können eine Veränderung in der Intensitätsverteilung an der Spitzenapertur hervorrufen, wie es in [Hecht, 1995] als „focusing effect“ bezeichnet wird. An gekrümmten Oberflächen wird danach die Intensitätsverteilung an der Spitzenapertur stärker räumlich gebündelt. Dadurch wird mehr Licht vom Objektiv gesammelt. Die Transmissionserhöhung im Zentrum von Partikeln und Melaninpigmenten kann damit erklärt werden.

Streuung an Phasenübergängen

Ein möglicher Effekt für die Erzeugung dunkler Ränder an Grenzflächen zwischen Partikeln und Epon ist die Verzerrung des elektromagnetischen Feldes an Übergängen zwischen Materialien verschiedener Brechungsindizes. Die Umgebung der Sondenapertur beeinflusst die Feldverteilung an der Apertur, wie schon in [Hecht, 1995, 1997] beschrieben. Dadurch kann die weitere Ausbreitungsrichtung des Lichtes beeinflusst werden und somit eine veränderte Detektion im Fernfeld verursachen.

Absorption

Absorbierende Materialien verringern die Transmission ähnlich wie in der klassischen Lichtmikroskopie. Dieser Tatsache kann es verdankt werden, daß trotz der genannten Einflüsse auf das NFOM-Bild absorbierende Substanzen auf glatten Substraten lokalisiert werden können.

Die Interpretation von Transmissionsmessungen mit dem NFOM erscheint als äußerst schwierig. Da alle oben erwähnten Einflüsse zum optischen Bild beitragen und von der Sondencharakteristik einzelner Spitzen sowie von den Meßparametern abhängen können, sind vor allem NFOM-Bilder von Proben mit strukturierter Oberfläche schwer richtig zu deuten.

Der Einfluß von Topographie auf die Transmission erscheint immer besonders deutlich, wenn die Probe keine besonders hohen absorbierenden Eigenschaften aufweist. Die Proben, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, besitzen alle keine ideal glatte Oberfläche. Die strukturierten Proben zeigen einen Kontrast im

Transmissionsbild, welcher sehr wahrscheinlich vor allem durch die Struktur der Oberfläche beeinflusst wird. Da bei den Dünnschnitten von Haaren oder Haut die Oberflächenstruktur auch wesentliche morphologische Regionen widerspiegelt, werden im Transmissionsbild diese Regionen ebenfalls dargestellt. Es kann nicht eindeutig entschieden werden, ob dieser Kontrast durch die Topographie induziert wird oder ob eine optische Eigenschaft der Probe gemessen wurde, weil die morphologischen Regionen auch unterschiedliche Brechungsindizes besitzen.

Stark absorbierende Proben, wie reine UV-Filtersubstanzen, können anhand ihrer optischen Eigenschaften lokalisiert werden. Unter Verwendung zweier Wellenlängen ist es möglich, Bereiche, in denen sich die UV-Filtersubstanz befindet, von Bereichen ohne Substanz zu unterscheiden, da die Absorption nur bei einer Wellenlänge auftritt.

6.6 Hautdünnschnitte

6.6.1 Humanhaut

Die Regionen unterscheiden sich in ihren Brechungsindizes, so daß in der lichtmikroskopischen Aufnahme die Morphologie dargestellt werden kann. Im NFOM-Bild sind diese Regionen nur teilweise abgebildet, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Unterschiede in den Brechungsindizes bei den meisten Regionen für einen Kontrast nicht ausreichen. Der Nucleolus im Zellkern erscheint im NFOM-Bild nicht, obwohl dieser Bereich im LM als dunkler Fleck deutlich zu erkennen ist.

Die NFOM-Messungen an Hautdünnschnitten zeigen zwar teilweise morphologische Strukturen, die sehr wahrscheinlich aber durch das Auftreten der gleichen Struktur in der Topographie erzeugt wird. Die schmalen Vertiefungen im SC führen zu einer Darstellung dieser Region der Haut. Die Transmissionsunterschiede zwischen Corneozyt und Zellzwischenraum sind zumindest nicht auf ein erhöhtes Absorptionsvermögen des Zellzwischenraumes zurückzuführen.

Im Gegensatz zum SC erscheinen Zellverbindungen bei den gezeigten Messungen nicht in der Topographie, so daß hier der Kontrast durch rein optische Eigenschaften in diesem Bereich der Probe erzeugt wird. Dies kann durch die unterschiedlichen Brechungsindizes des Zellzwischenraumes (vermutlich penetriertes Epon) und der Zellverbindungen verursacht werden.

6.6.2 Lokalisation eines UV-Filters in einem Hautdünnschnitt

Die Nachweisgrenze, die für einen UV-Filter abgeschätzt wurde, liegt bei 10nm Schichtdicke oder ca. 170000 Molekülen, die sich unterhalb der Spitzenapertur befinden müssen, damit eine Intensitätsverringerng von 5% erzeugt wird. Bei einem 200nm Hautdünnschnitt bedeutet dies, daß 5% des Dünnschnittes den UV-Absorber beinhalten muß (unter Annahme einer gleichmäßigen Bestrahlung eines Zylinders mit $d=150\text{nm}$ und $h=200\text{nm}$). Bei einer Applikation von $2\text{mg}/\text{cm}^2$ einer Emulsion, die zu 4% einen UV-Filter besitzt, könnten je nach Molekulargewicht ca. 10^{16} Moleküle in die Haut diffundieren. Projiziert man alle Lichtfiltermoleküle auf die behandelte Hautoberfläche, so könnten sich theoretisch 100 Moleküle auf einem Quadratnanometer befinden. Dies bedeutet, daß von einer Fläche von 17671nm^2 ausgehend (entspricht Aperturfläche für $d=150\text{nm}$) etwa $1,77 \cdot 10^6$ Moleküle in die Haut penetrieren könnten. Da sich für eine ausreichende Detektion ca. $1,7 \cdot 10^5$ Moleküle auf einer gleich großen Fläche befinden müssen, sollten etwas mehr als 10% der Lichtfiltersubstanz in die Haut diffundieren. Nach Erfahrungswerten aus der Untersuchung von Penetrationsversuchen mit UV-Filtern mit der Stripping-Methode penetrieren höchsten 5% in den noch lebenden Teil der Epidermis [Pflücker, 1998]. Nur im oberen Stratum corneum könnte demnach die Lichtfilterkonzentration hoch genug sein, um mit dem NFOM detektiert zu werden. Bei Sondenaperturen von 50nm im Durchmesser liegt die Detektions sensitivität 9 mal höher, so daß mit derartigen Sonden eine ausreichende Empfindlichkeit für eine Lokalisation von UV-Filtern in Haut gegeben wäre. Aus diesem Grund ist der Einsatz von Sonden mit möglichst kleinen Aperturen unbedingt erforderlich.

Da die Transmissionsbilder allerdings nicht nur von der reinen Absorption bestimmt werden und in weiten Teilen eine inhomogene Transmission im UV-Bereich und im

sichtbaren Bereich zu vermerken ist, ist eine eindeutige Aussage mit dem NFOM auch mit besseren Sonden nicht möglich.

Die Transmissionsunterschiede bei unbehandelter Haut können im SC 14% ausmachen, wie die Messungen im UV-Bereich zeigten. Daher erscheint es äußerst unwahrscheinlich, in dieser Region Aufschluß über den Verbleib eines UV-Absorbers zu erlangen. Die Penetration von Substanzen vollzieht sich durch die Zellzwischenräume beziehungsweise durch die Lipidmatrix, so daß bei Penetration nur mit einem Verbleib in diesem Bereich des SC zu rechnen wäre. Da aber genau dort ohnehin schon die Transmission stark verringert wird, kann keine eindeutige Aussage über den Verbleib eines UV-Absorbers gemacht werden. Die Lokalisation eines UV-Absorbers im inneren Bereich der Haut ist ebenfalls aufgrund der stark inhomogenen Transmission in weiten Teilen der Epidermis als unmöglich anzusehen. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Strukturen im Transmissionsbild durch rein optische Eigenschaften oder Topographieeffekte verursacht werden. Die Transmission ist so inhomogen, daß UV-Absorber nicht eindeutig lokalisiert werden können.

Das grundsätzliche Problem besteht darin, daß das Transmissionsbild von der Abstrahlcharakteristik einer Sonde abhängt, welche stark variieren kann. Dadurch ist es nicht möglich, Transmissionsgrade einer bestimmten Wellenlänge für die jeweiligen Schichten und Regionen der Haut quantitativ zu ermitteln und diese Werte in vergleichenden Untersuchungen einzusetzen.

Ein weiteres Problem stellt die Präparation der Haut dar. Durch die notwendigen Entwässerungsschritte und die Einbettung in ein Harz können die UV-Filter aus der Haut wieder herausgewaschen werden, so daß die vorliegenden Konzentrationen artifiziell sind. Eine mögliche Kryopräparation, bei der Haut eingefroren wird und bei tiefen Temperaturen geschnitten wird, ist sicherlich eine schonendere Präparationsmethode. Die Dünnschnitte müßten allerdings langsam aufgetaut werden. Hier stellt sich jedoch die Frage, was beim Sublimieren des Wassers geschieht. Die Bildung kleiner Eiskristalle und Zerstörung der Feinstruktur sind bei diesem Prozeß nicht auszuschließen. Des Weiteren haben die Erfahrungen auf diesem Gebiet gezeigt, daß die Dünnschnitte eine sehr viel rauhere Oberfläche

besitzen als die konventionell hergestellten Dünnschnitte. Gerade dies würde sich negativ auf die NFOM-Untersuchungen auswirken.

6.6.3 Immunmarkierte Haut

Die Übereinstimmung der Strukturen von CLSM-Messung und NFOM-Messung deutet darauf hin, daß die Kontrastbildung in der nahfeldoptischen Mikroskopie bei Fluoreszenzmessungen ähnlich der klassischen Lichtmikroskopie sein muß. Die Verteilung dieses fluoreszierenden Markers zeigt Bereiche, in denen das Cytokeratin10 vorkommt. Das Cytokeratin10 ist ein Protein der Intermediärfilamente, dessen Synthese erst oberhalb des Stratum basale beginnt [Schaefer, 1996]. Es ist ein Bestandteil der bündelartigen Filamente im Cytoplasma der Zellen und tritt nicht in den Zellkernen und Zellzwischenraum auf. Aus diesem Grund sind diese Bereiche nicht angefärbt und zeigen keine Fluoreszenz.

Die CLSM-Messung zeigt keinerlei Ausbleicherscheinungen nach den durchgeführten NFOM-Messungen. Dies spricht für eine relativ geringe Leistung in den NFOM-Messungen. Das Ausbleichen des Fluorophors erscheint dagegen bei CLSM-Messungen nach nur wenigen Sekunden. Dies liegt daran, daß die eingebrachte Energie pro Pixel bei den CLSM-Messungen um 3-4 Größenordnungen größer ist als bei den NFOM-Messungen.

Die erzielten lateralen Auflösungen bei den gezeigten Messungen sind um 130nm abgeschätzt worden und demonstrieren das Potential der NFOM. Mit dem NFOM ist es möglich, Aussagen über die genaue Verteilung bestimmter Proteine oder Lipide in der Haut zu treffen, wenn entsprechende Antikörper schon vorhanden sind oder hergestellt werden können. Dies gilt auch für Substanzen, die nicht in der Haut natürlich vorkommen und in die Haut penetrieren. So wäre es denkbar, die Verteilung von bestimmten Substanzen in der Haut nachzuweisen und eine Lokalisation mit einer Genauigkeit von ca. 100nm in der Haut darzustellen.

6.7 Haardünnschnitte

6.7.1 Melaninpigmente im Haar

Die dargestellten NFOM-Messungen stehen im Widerspruch zur Abbildung mit der klassischen Lichtmikroskopie. Da sich die Kontrastbildung in der NFOM-Messung offensichtlich nicht durch rein optische Eigenschaften der Probe erklären läßt, muß davon ausgegangen werden, daß hier Einflüsse der Topographie auf das Transmissionsbild eine größere Rolle spielen. Die Melaninpigmente absorbieren im gesamten Spektralbereich des Lichtes und sollten daher auch bei NFOM-Messungen dunkel erscheinen. Die Ergebnisse zeigten jedoch, daß bei Verwendung sichtbaren Lichtes nur bei einigen Pigmenten eine Verringerung der Transmission hervorgerufen wird. Die Pigmente, welche mit dunklem Ring und hellem Zentrum erscheinen, weisen eine gekrümmte Oberfläche auf. Bei diesen Pigmenten überwiegt offenbar der topographische Einfluß, so daß keine Absorption zu sehen ist. Im Gegensatz dazu erscheinen relativ glatte und größere Pigmente dunkel. Eine mögliche Erklärung wäre eine fokussierende Wirkung, die durch die gekrümmte Oberfläche hervorgerufen wird.

Im UV-Bereich wird die Transmission dagegen stark verringert. Dies liegt sehr wahrscheinlich an dem höheren Absorptionskoeffizienten von Melanin bei tieferen Wellenlängen. Bei der Messung im UV-Bereich überwiegt die optische Eigenschaft der Probe bei der Kontrastbildung, so daß Topographieeffekte überdeckt werden.

In Analogie zu TEM-Aufnahmen sind die Strukturen in der Topographie von Dünnschnitten nicht zufälliger Natur, sondern spiegeln Strukturen der Haarmorphologie wieder. Die AFM-Topographien offenbaren durch die gute laterale Auflösung Haarstrukturen wie Makrofibrillen, Endo- und Exocuticula. Bei den Vertiefungen mit mehreren Mikrometern Ausmaß handelt es sich wahrscheinlich um Zellkernreste von Cortexzellen. Die Ursache für die Abbildung der Haarmorphologie in der Topographie ist im Schneidevorgang und den mechanischen Eigenschaften der Proben zu suchen. Die verschiedenen mechanischen Eigenschaften der morphologischen Regionen führen zu unterschiedlichem Bruchverhalten beim

Schneidevorgang. Dies gilt auch für die Erzeugung des Oberflächenreliefs bei Hautdünnschnitten. Eine ideal glatte Probe kann nicht hergestellt werden, so daß topographische Einflüsse auf das NFOM-Bild hingenommen werden müssen.

6.7.2 Penetration eines Fluorophors

Die Fluoreszenzmessungen an Dünnschnitten von Haaren, die zuvor mit einem Fluorophor angefärbt wurden, zeigen Strukturen im Haarinneren, die im wesentlichen mit den CLSM-Messungen übereinstimmen. Der Vergleich von Topographie und optischem Bild der NFOM-Messung zeigt keine Korrelation. Daher kann wie bei den immunmarkierten Hautproben davon ausgegangen werden, daß der Kontrast hauptsächlich durch die Fluoreszenz des Farbstoffes und nicht durch topographiebedingte Einflüsse gegeben wird.

Geht man davon aus, daß die Signalstärke der Fluoreszenz mit der lokal vorliegenden Konzentration des Fluorophors übereinstimmt, zeigen die Fluoreszenzbilder die Verteilung des Farbstoffes in dem Haarinneren.

Die Diffusion in ein Haar hängt im wesentlichen von den Eigenschaften der Substanz und den Umgebungsbedingungen ab. Die hier gewählten Konditionen wurden vorgenommen, um eine Diffusion in den gesamten Bereich des Cortex zu erzielen. Die Ursache für die gezeigten Strukturen liegt darin, daß die schwach vernetzten Bereiche (ZMK, Endocuticula) bei den eingesetzten Temperaturen weich sind und einen höheren Diffusionskoeffizienten besitzen. Die Moleküle diffundieren demnach in erster Linie zunächst durch alle schwach vernetzten Bereiche wie den ZMK und gelangen dann durch das intermakrofibrillare Material in die Cortexzellen bis sie die Zellkernreste erreicht haben [Wortmann, 1997].

Die Bedingungen führten zu einer einheitlichen Anfärbung der Cortexzellen, aus denen Zellkernreste deutlich durch eine erhöhte Fluoreszenz hervorstechen. Der Grund dafür kann darin liegen, daß die Zellkernreste nur schwach vernetzt sind und damit das Material eine geringe Dichte aufweist. Dadurch können sich mehr Moleküle einlagern als in den übrigen Regionen des Haares. Die Topographie kann bei NFOM-Untersuchungen nützliche Zusatzinformationen liefern. Die starke

Fluoreszenz der Zellkernreste kann nicht auf eine erhöhte Schichtdicke des Haarmaterials zurückgeführt werden, da diese Bereiche sogar dünner sind als das umgebende Haarmaterial.

Zusätzlich erscheint eine Vernetzung schmaler Kanäle, welche vermutlich den ZMK darstellen. Diese Netzstruktur korreliert mit dem ZMK und weist in einigen Bereichen sehr kleine Strukturen auf, die aufgrund der Schnittebene erzeugt werden. Dies soll Abb. 40 verdeutlichen, in der eine mögliche Schnittebene durch ein Haar eingezeichnet ist. Die länglichen Cortexzellen sind an ihren Enden verzahnt, so daß ein Schnitt durch diesen Bereich zu sehr kleinen Netzstrukturen führt.

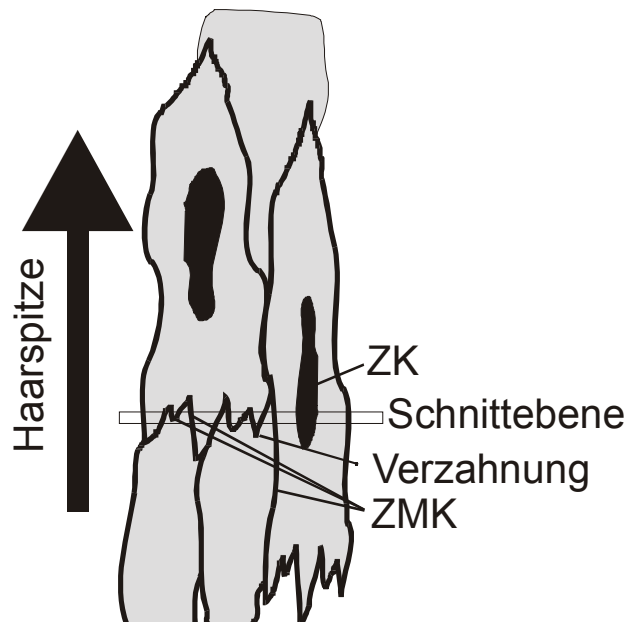


Abb. 40: Schnittebene durch Cortexzellen. Zk=Zellkernrest, ZMK=Zellmembrankomplex.

Die inhomogene Anfärbung der Cuticula wird durch den bevorzugten Penetrationsweg durch die Endocuticula und ZMK hervorgerufen. Dadurch erscheint eine Cuticulazelle mit einem hellen und einem dunkleren Bereich. Die beschriebene Verteilung der Fluoreszenz ist typisch für eine Penetration aus nicht-wässrigen Lösungen, wie schon in [Wortmann, 1997] erwähnt.

Bei den dunklen Spots im Cortex handelt es sich vermutlich um Melaninpigmente, die keine Fluoreszenz zeigen. Die Pigmentkörner besitzen eine äußere Membran, innerhalb derer das Melanin eingelagert ist [Kassenbeck, 1991]. Entweder blockiert die Membran selbst das Eindringen des Farbstoffes oder das dicht gepackte Polymer

verhindert eine vermehrte Einlagerung des Fluorophors. Möglicherweise wird aber auch das erzeugte Fluoreszenzlicht vom Melanin selbst absorbiert, so daß kein Signal detektiert werden kann.

Die Darstellung von Fluoreszenzverteilungen im Haarinneren und damit auch preferierter Diffusionswege in das Haarinnere kann mittels NFOM mit hoher Auflösung durchgeführt werden. Die erzielten lateralen Auflösungen lagen typischerweise bei 130nm und sind damit um den Faktor zwei höher als die erreichten Auflösungen in den CLSM-Messungen.

6.8 Konsequenzen für Penetrationsstudien mit dem NFOM

6.8.1 Transmission

NFOM-Untersuchungen an Proben, die eine Oberflächenstruktur aufweisen, können im Transmissionsmodus keine eindeutige Aussage über den Verbleib von Substanzen liefern. Auch unter Verwendung mehrerer Wellenlängen ist dies nicht möglich, weil eine NFOM-Abbildung zu stark von topographischen Einflüssen bestimmt wird. Ein grundsätzliches Problem stellen die Sonden dar, deren Abstrahlcharakteristik stark voneinander abweichen kann. Damit sind quantitative Messungen nicht möglich. Eine Verbesserung der Sondenaperturen hinsichtlich der Größe und der Form wäre notwendig, um nicht zuletzt die Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit bei Transmissionsmessungen zu erhöhen.

Kleinere Aperturen würden zudem auch zu höheren lateralen Auflösungen führen. Die Auflösung von Strukturen um 100nm ist zwar schon eine Verbesserung zur klassischen Lichtmikroskopie, wird aber unter Verwendung von UV-Licht durch konfokale Systeme erreicht. Die Herstellung von Sonden mit Aperturen um 20nm-30nm ist durchaus möglich. Das Problem ist aber die Realisierung eines Herstellungsprozesses, bei dem die Reproduzierbarkeit der Sondenaperturen gegeben ist.

6.8.2 Fluoreszenz

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen demonstrieren ein weitaus höheres Potential der NFOM hinsichtlich der Penetration von Substanzen in das Haar- oder Hautinnere. Die Übereinstimmung mit der klassischen LM zeigt, daß die Abbildungen im wesentlichen durch die Fluoreszenz des jeweiligen Fluorophors erzeugt wird. Die Auflösungen könnten mit verbesserten Sonden sicherlich noch um den Faktor 2 erhöht werden. Die Möglichkeit, mit lateralen Auflösungen unter 100nm Substanzen in Dünnschnitten zu lokalisieren, könnte neue Aufschlüsse über das Diffusionsverhalten liefern.

Die Lokalisation von UV-Filtern in Dünnschnitten, die eine Eigenfluoreszenz besitzen, ist mit herkömmlichen Sonden sehr problematisch. Die Eigenfluoreszenz der Fasern kann nicht vom Signal getrennt werden, welches von der Probe ausgeht. Für derartige Untersuchungen wären allerdings NFOM-Sonden geeignet, die nicht aus Fasern bestehen. Diese Sonden basieren auf metallbedampfte AFM-Cantilever, an deren Spitze eine Apertur erzeugt wird und Licht auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert wird [Mihalcea, 1996]. Derartige Sonden sind noch nicht auf dem kommerziellen Markt erhältlich. Zudem würde die Verwendung eine vollständige Umgestaltung des vorhandenen Systems erforderlich machen.

Der Nachteil von Fluoreszenzmessungen liegt in der Notwendigkeit einer fluoreszierenden Substanz. Es ist zwar durchaus denkbar zu untersuchende Substanzen mit Fluorophoren zu markieren, jedoch ändert dieses möglicherweise wiederum das Penetrationsverhalten. Der Nachweis über eine Immunmarkierung nach Penetration der Substanz wäre sicherlich aussagekräftiger für das Diffusionsverhalten. Hier ergibt sich allerdings das Problem, daß nicht für jede Substanz Antikörper hergestellt werden können.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein kommerzielles NFOM so weit umgerüstet, daß Messungen im UV-Bereich bis 300nm und Fluoreszenzmessungen im sichtbaren Bereich ermöglicht wurden. Die Zählraten waren in der Regel hoch genug, um Messungen unterhalb eines 5%-igen Rauschens im sichtbaren- und im UV-Bereich durchzuführen. Die Ergebnisse demonstrierten eine Detektionsempfindlichkeit des Systems, die es ermöglicht, bei niedrigen Anregungsleistungen von ca. 10nW und Sondenaperturen von ca.100nm im Durchmesser noch 5500 fluoreszierende Moleküle detektieren zu können. Die grundsätzlichen Voraussetzungen für Untersuchungen zur Penetration von lichtabsorbierenden und fluoreszierenden Substanzen in Haut und Haaren sind damit erfüllt worden.

Es konnten UV-Filter anhand ihrer Absorption im UV-Bereich mit dem NFOM auf Glasträgern und in Epondünnschnitten abgebildet werden. Durch den Vergleich zweier Messungen mit verschiedenen Wellenlängen war es möglich, UV-Absorber aufgrund der verringerten Transmission bei einer der beiden Wellenlängen eindeutig zu lokalisieren. Die Anzahl der notwendigen Moleküle, die zu einer 5%-igen Transmissionsverringering beitragen müssen, wurde zu 170000 abgeschätzt.

Die Dünnschnitte von Haut zeigten eine Mischung aus optischen Eigenschaften und Topographie bei allen zur Verfügung stehenden Wellenlängen. Dies führte zu einer Darstellung wesentlicher Strukturen der Haut im optischen Transmissionsbild. Die eindeutige Trennung von der reinen Absorption und allen anderen kontrastgebenden Eigenschaften der Probe (Schichtdicken, Streuung, Oberflächenprofil) ist durch zwei nacheinander durchgeführten Messungen mit unterschiedlichen Wellenlängen nicht möglich. Zudem stellte sich heraus, daß bei den zur Verfügung stehenden Sonden die Sensitivität nicht hoch genug ist, um einen ausreichenden Kontrast zu erzielen. Eine Penetration von mehr als 10% des UV-Filters in die Epidermis könnte einen ausreichenden Kontrast herbeiführen, jedoch sind nach anderen Untersuchungsmethoden nicht mehr als 5% des UV-Filters zu erwarten. Aus diesen Gründen ist eine Untersuchung zur Penetration von Substanzen an Dünnschnitten mit dem NFOM im Transmissionsmodus nicht sinnvoll.

Eine Darstellung von Hautstrukturen mit Hilfe der Immunmarkierung konnte in den Fluoreszenzmessungen mit dem NFOM durchgeführt werden. Die Fluoreszenzbilder waren mit den klassischen Lichtmikroskopieaufnahmen vergleichbar und zeigten mit lateralen Auflösungen um 130nm die Verteilung des Cytokeratin10 in der Epidermis. Damit eröffnet sich grundsätzlich eine Alternative für eine hochauflösende Lokalisation von Substanzen im Hautinneren, falls sich die zu untersuchende Substanz durch Antikörper markieren läßt.

Anhand einer Penetrationsstudie eines Fluoresceinderivates an Humanhaaren konnte ebenfalls das Potential der NFOM demonstriert werden. Die Verteilung im Haarinneren des fluoreszierenden Fluorochrome zeigte bevorzugte Penetrationswege von Fluorophoren in das Haarinnere aus nicht-wäßrigen Lösungen. Der direkte Vergleich von NFOM und CLSM bestätigte, daß Fluoreszenzmessungen mit dem NFOM einen nahezu identischen Kontrast wie die klassische Lichtmikroskopie liefern. Die Auflösungen lagen auch hier bei ca. 130nm im NFOM. Die genaue Lokalisation von Farbstoffen oder von fluoreszenzmarkierten Substanzen im Haarinneren kann Rückschlüsse auf die Wirkungsweise der angewendeten Produkte in der kosmetischen Industrie geben.

Letztlich sind in der reinen Transmissionsmessung zu viele Faktoren für die Kontrastbildung maßgebend, so daß die Lokalisation anhand der Absorption von absorbierenden Substanzen bei stark strukturierten Oberflächen nicht eindeutig durchgeführt werden kann. Im Fluoreszenzmodus kann die NFOM dagegen aufgrund der hohen lateralen Auflösung neue Erkenntnisse hinsichtlich der Penetration von fluoreszierenden Substanzen liefern.

8 Summary

In this work a commercially available scanning near-field optical microscope was modified, in order to operate at 300nm and to perform fluorescence measurements in the visible wavelength range. The noise of the images was below 5% due to a sufficient counting rate in the UV and visible wavelength range. Furthermore, the results have demonstrated that 5500 fluorescent molecules could be detected with an exciting light power of 10nW. Therefore the basic prerequisites are achieved to investigate a penetration of UV-absorbers and fluorescent molecules into skin and hairs.

UV-absorbers have been localized on a glass-slide and in epon thin cross-sections, because of their absorbance in the UV-light range. The comparison of two optical images with different wavelength enabled a clear localisation of the UV-absorber by its absorption properties at a defined wavelength. The amount of absorbing molecules, which are required for a 5% signal reduction, was estimated to be 170000.

The images of ultra thin cross-sections of human skin have shown a mixture of optical properties and topographical influences at all available wavelengths. This leads to an image of morphological structures of skin in transmission mode. The separation of absorbance from all kind of other properties influencing the optical contrast (thickness, scattering, surface profile) is not possible by measuring with two different wavelengths. Additionally it was found that the sensitivity for a sufficient contrast generation due to absorbance of the UV-absorbers is not high enough using the available probes. A penetration of more than 10% of the applied UV-absorber is required to give a chance of a localisation in the epidermis.

It was possible to represent immuno labeled structures of skin operating in fluorescence mode. The NFOM images were comparable with classical light microscopy and have shown the distribution of cytokeratin10 with a lateral resolution of about 130nm. This gives an alternative for a localisation of substances in skin with high resolutions, if it is possible to label the substance by an antigene.

Another penetration study of fluorescent molecules into human hairs has also demonstrated the high potential of NFOM in fluorescence mode. The distribution of a fluorescein derivate has shown preferred penetration pathways into human hairs in non aqueous solutions. The direct comparison of CLSM and NFOM images confirms the statement, that the contrast is nearly identical to classical light microscopy. The exact distribution of fluorophors or fluorescent labeled substances may help to understand the principle interactions of applied cosmetic products in the future.

Finally the contrast mechanism in transmission mode of the NFOM is dependent on many factors, which do not allow a clear localisation of absorbing substances in structured sample surfaces. In fluorescence mode the NFOM offers an alternative to classical light microscopy, which can provide new knowledge with regard to a penetration of fluorescent substances due to the higher lateral resolution.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Beugungsmuster einer Welle, die an einer Lochblende gebeugt wurde. I=Intensität, X= Ortskoordinate.....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops.....	8
Abb. 3: Meßprinzip der Nahfeldoptik für verschiedene Meßmodi.	10
Abb. 4: Schematische Darstellung eines nahfeldoptischen Mikroskops in Transmissionsstellung.	11
Abb. 5: a) Prinzipieller Aufbau einer NFOM-Sonde bestehend aus einer Lichtleitfaser, die mit Aluminium beschichtet wurde. b) Relative Lichtleistung, die bei derartigen Sonden aus der Apertur gelangt.....	13
Abb. 6: a) Intensitätsverteilung in xy-Richtung für P- und S-Polarisation. b) Intensitätsverteilung in z-Richtung für verschiedene Aperturdurchmesser aus [Novotny, 1996].	14
Abb. 7: Hautmodell aus [Derma, BDF 1998].	17
Abb. 8: a) Haarfollikel aus [Schwan-Jonczyk, 1999], 1 Oberhaut, 2 Hornschicht, 3 Haarschaft, 4 Haarwurzel, 5 Wurzelscheide, 6 Schweißdrüse, 7 Talgdrüse, A ₁ Haarfollikel in anagener Phase, A ₂ Beginn der anagenen Phase, T telogene Phase, K Kolbenhaar (nicht mehr wachsendes Haar), P Papille, b) Volumenänderung von Haaren in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit, aus [Zviak, 1986].	21
Abb. 9: Vereinfachtes Haarmodell nach [ZAHN, 1997].....	24
Abb. 10: REM-Aufnahme eines Humanhaares, welches mit 10nm Gold bedampft wurde. Die Kanten der Cuticulazellen sind deutlich zu erkennen.	25
Abb. 11: Veranschaulichung der Diffusionswege durch die Cuticula in das Haarinnere.....	26
Abb. 12: Schematischer Aufbau des NFOM. 1 Argon-Laser, 2 Abschwächer, 3 Einkoppeloptik, 4 Glasfaser, 5 Fasersplice, 6 Quarzstimmgabel, 7 spitzzulaufende Glasfaser, 8 Objektiv, 9 verkipperbarer Spiegel, 10 Piezoscanner, 11 Umlenkprisma, 12 Okular, 13 Beamsampler, 14 Single Photon Counter, 15 Photomultiplier, 16 digitale Datenverarbeitung und elektronische Steuerung....	27
Abb. 13: a) NFOM-Sonde bestehend aus Quarzstimmgabel und spitzzulaufender Glasfaser. b) REM-Aufnahme einer NFOM-Spitze aus [Isaacson, 1992].	31
Abb. 14: Spektrale Quantenausbeute der eingesetzten Photomultiplier (nach Herstellerangaben).	32
Abb. 15: Relative Transmissionskurven verwendeter Filter nach Herstellerangaben.	33
Abb. 16: Transmissionskurven der benutzten Kantenfilter GG495 und OG515 für Fluoreszenzmessungen.	34
Abb. 17: Schematisiertes Prinzip der Ultramikrotomie. Das „Fischen“ der Dünnschnitte geschieht dabei mit Hilfe einer Kupferschlinge, in der sich ein Wasserfilm bildet. Die Schnitte können dadurch auf einem Objektträger platziert werden.....	38
Abb. 18: Standardprobe. Aluminiumstrukturen auf Glasträger. a) Topographie, b) Transmission bei 351nm.	42
Abb. 19: Titandioxidpartikel in einem 100nm Eponschnitt. a) Topographie, b) Transmission bei 351nm, c) Transmission bei 305nm.	43
Abb. 20: UVA-Filter auf Glasträger. a) Topographie, b) Transmissionsbild bei 351nm, c) Transmissionsbild der gleichen Stelle bei 501nm.....	46

Abb. 21: UVA-Filter auf Glasträger. a) Topographie, b) Transmissionsbild bei 351nm. Die Pfeile markieren Bereiche, in denen die Übereinstimmung fehlender UV-Filtersubstanz und hoher Transmission besonders gut zu erkennen ist.....	47
Abb. 22: UVA-Filter auf Glasträger. a) Topographie, b) Transmission bei 351nm, c) Fluoreszenz 400-600nm, d) rel. Transmission eines Linienprofils gegen die Höhen aufgetragen.....	48
Abb. 23: 200nm Dünnschnitt in Epon eingebetteter Zinkoxidpartikel. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) Transmission bei 514nm. Z = Zinkoxidpartikel, A = Aufwölbung.....	50
Abb. 24: 200nm Dünnschnitt in Epon eingebetteter Zinkoxidpartikel. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) Transmission bei 514nm und Linienprofile der markierten Bereiche.	52
Abb. 25: 200 nm Dünnschnitt konventionell eingebetteter Haut. a) Lichtmikroskopische Aufnahme, b) NFOM-Transmission bei 501nm. ZK = Zellkern, ZV = Zellverbindungen, N = Nucleolus, SC = Stratum corneum.....	53
Abb. 26: 200nm Dünnschnitt konventionell eingebetteter Haut. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) lichtmikroskopische Aufnahme an gleicher Stelle des Dünnschnittes, d) Transmission bei 501nm.....	54
Abb. 27: 200nm Dünnschnitt konventionell eingebetteter Haut. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) Topographie, d) Transmission bei 364nm. Die Pfeile markieren Bereiche, in denen Topographie und Transmission korrelieren. A = Ablagerung, SC = Stratum corneum, ZK = Zellkern.	55
Abb. 28: Linienprofile aus Abb. 27. a) Transmissionsprofil aus Abb. 27b, b) Transmissionsprofil aus Abb. 27d, c) Höhenprofil aus Abb. 27a, d) Höhenprofil aus Abb. 27c. E=Epon, A=Ablagerung, SC=Stratum corneum.	57
Abb. 29: 200nm Dünnschnitt konventionell eingebetteter Haut nach Auftrag eines UV-Filters. a) Topographie, b) Transmission bei 364nm, c) Topographie, d) Transmission bei 501nm. SC=Stratum corneum, E=Epon, A=Ablagerung.	58
Abb. 30: 200nm Hautdünnschnitt nach Immunmarkierung. Durch die Anfärbung des Cytokeratins erscheinen morphologische Strukturen der oberen Epidermis. a) NFOM-Fluoreszenz, b) NFOM-Fluoreszenz, c)NFOM-Fluoreszenz, d) CLSM-Fluoreszenz. SC=Stratum corneum, ZK=Zellkern, C=Corneozyt, ZV=Zellverbindungen.	59
Abb. 31: TEM-Aufnahme eines 50nm Dünnschnittes eines in Epon eingebetteten Haares. Der Dünnschnitt wurde mit Uranylacetat angefärbt. EN=Endocuticula, EX=Exocuticula, E=Epon, M=Melaninpigmente, ZMK=Zellmembrankomplex, ZK=Zellkernrest.....	61
Abb. 32: 200nm Dünnschnitt eines Haares. a) Topographie, die vier Melaninpigmente sind mit einem M bezeichnet worden, die Pfeile markieren Löcher im Haarmaterial, b) Transmission bei 501nm, c) lichtmikroskopische Aufnahme 100Xölobjektiv, d) Transmission bei 351nm (leicht verschobener Rasterbereich).....	62
Abb. 33: Linienprofile durch die in angezeigten Bereiche. a) rel. Transmission bei 501nm, b) rel. Transmission bei 351nm, c) Topographieprofil, d) Topographieprofil.	63
Abb. 34: NFOM-Messung an einem 50nm Dünnschnitt eines asiatischen Haares in Epon eingebettet. a) Topographie, b) Transmission bei 488nm, c) AFM-Topographie der gleichen Probe, d) AFM-Topographie mit erhöhter Auflösung. M=Melaninpigmente, EN=Endocuticula, EX=Exocuticula, ZK=Zellkernrest, MF=Makrofibrillen, E=Epon.....	64

Abb. 35: 50nm Dünnschnitt eines Haares nach Penetration eines Fluoresceinderivates. a) CLSM-Messung, b) NFOM-Fluoreszenz, c) Topographie. C=Cuticula, E=Epon.	66
Abb. 36: 200nm Dünnschnitt eines Haares nach Penetration eines Fluoresceinderivates. a) CLSM-Messung, b) Zoom aus a), c) Topographie, d) NFOM-Fluoreszenz an der gleichen Stelle wie in b).	67
Abb. 37: Linienprofile durch die in Abb. 36 markierten Bereiche. a) CLSM-Messung, b) NFOM-Messung. Die Halbwertsbreiten der Signale einer punktförmigen Struktur wurden zu a) 240nm und b)130nm bestimmt.	68
Abb. 38: Längsschnitt eines Haares nach Penetration eines Fluoresceinderivates. a) Topographie, b) NFOM-Fluoreszenz.	69
Abb. 39: Schematisch skizzierter Kanteneffekt.	77
Abb. 40: Schnittebene durch Cortexzellen. Zk=Zellkernrest, ZMK=Zellmembrankomplex.	85

10 Literaturverzeichnis

Albrecht T.R., Grütter P., Horne D., Rugar D. (1991), Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity, *J. Appl. Phys.* 68, 668-673.

Anderson M.W., J.P. Hewitt, S.R. Spruce (1997), Broad-Spectrum physical sunscreens: Titan dioxide and zinc oxide, in: *Sunscreens*, N.J. Lowe et al., Marcel Dekker Verlag, New York, USA, 353-367.

Betzig E., Isaacson M., Lewis A. (1987), Collection mode near- field scanning optical microscopy , *Appl. Phys. Lett.* 51(25), 2088-2090.

Betzig E., Trautman J.K., Harris T.D., Weiner J.S., Kostelak R.L. (1991), Breaking the diffraction barrier, optical microscopy on a nanometer scale, *Science* 251, 1468-1470.

Betzig E., Trautman J.K. (1992), Near- field optics, microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit, *Science* 257, 189-195.

Betzig E., Trautman J.K., Weiner J.S., Harris T.D., Wolfe R. (1992), Polarization contrast in near- field scanning optical microscopy, *Applied Optics* 31(22), 4563-4568.

Betzig E., Chichester R.J. (1993), Single molecules observed by near-field scanning microscopy, *Science* 262, 1422-1425.

Bereiter-Hahn J., Matoltsy A.G., Richards K.S. (1986), *Biology of the integument*, Springer-Verlag, Berlin, 255-269.

Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., Weibel E. (1982), Tunneling through a controllable vacuum gap, *Appl. Phys. Lett.* 40, 178.

Binnig G., Quate C.F., Gerber C.H. (1986), Atomic force microscopy, *Physical Review Letters* 56(9), 930-932.

Brady P.R. (1992), Diffusion of dyes in natural fibres, *Rev. Prog. Coloration* 22, 58-78.

Brunner R., Bietsch A., Hollricher O., Marti O. (1997), Distance control in near-field optical microscopy with piezoelectrical shear-force detection suitable for imaging in liquids, *Rev. Sci. Instrum.* 68, 1769-1772.

Chapman S.J., Walsh A. (1990), Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis, *Arch. Dermatol Res.* 282, 304-310.

Chen Y., Kottler V., Chappert C., Essaidi N. (1999), Magneto-optical contrast in near-field optics, *Journal of Microscopy* 194 (2/3), 495-499.

Ciraci S. (1995), Forces in scanning probe microscopy, in: *Forces in scanning probe microscopy*, H.J. Güntherodt, Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 133-147.

Cleveland J.P., Anczykowsky B., Schmid A. E., Elings V.B. (1998), Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy, *Appl. Phys. Lett.* 72(20), 2613-2615.

Deckert V., Zeisel D., Zenobi R. (1998), Near-field surface enhanced raman imaging of dye labeled DNA with 100nm resolution, *Analytical Chemistry* 70(13), 2646-2650.

Diembeck W., Grimmert A (1995), Standard Protocol. Percutaneous absorption/penetration in vivo excised pig skin, in: *Cosmetic ingredients: Guidelines for percutaneous absorption/penetration. The European cosmetic, Toiletry and Perfumery Association(COLIPA)*.

Dürig U., Pohl D. W., Rohner F. (1986), Near- field optical-scanning microscopy, *J. Appl. Phys.* 59(10), 3318-3327.

Durkan C., Shvets I.V. (1996), Investigation of the physical mechanism of shear-force imaging, *J. Appl. Phys.* 80(10), 5659-5664.

Elias, P.M., Eugene, M.D., Cooper R., Korc A., Brown B.E. (1981), Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition, *J. Invest. Dermatol.* 76, 297-301.

Elias, P.M. (1983), Epidermal lipids, barrier function, and desquamation, *J. Invest. Dermatol.* 80, 44S-49S.

Elias P.M. (1991), Epidermal barrier function: intercellular lipid structures. Origin, composition and metabolism, *J. Controlled Release* 15, 199-208.

Erlandsson R., Olsson L., Martensson P., (1996), Inequivalent atoms and imaging mechanisms in AC-mode atomic force microscopy of Si(111) 7x7, *Phys. Rev.B* 54, 8309-8312.

Fischer U. C. (1985), Optical characteristics of a 0.1 μ m circular apertures in a metal film as light sources for scanning ultramicroscopy, *J. Vac. Sci. Technol.* B3, 386-390.

Fischer U. C. (1990), Resolution and contrast generation in scanning near field optical microscopy, in: *Scanning tunneling microscopy and related methods*, R.J. Behm et al., Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 475-496.

Forslind, B. (1994), A domain mosaic model of skin barrier, *Acta Dermato Venerol* 74, 1-6.

Forslind, B., Enström S., Enblom J., Norlen L. (1997), A novel approach to the understanding of human skin barrier function, *J. Derm. Science* 14: 115-125.

Frantini A., Powell B.C., Rogers G.E. (1993), Sequence, expression and evolutionary conservation of a gene encoding a Glycine/Tyrosine-rich Keratin associated protein of hair, *J. Biol. Chem.* 268(6), 4511-4548.

Fuchs H. (1994), SXM- Methoden- nützliche Werkzeuge für die Praxis?, Phys. Blätter 50(9), 837-843.

Greffret J.J., Carminati R. (1996), Theory of imaging in the near-field microscopy, in: optics at the nanometerscale, M. Nieto-Vesperinas and N. Garcia, Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 1-26.

Gregor M., Blohme P.G., Schöfer J., Ulbrich R.G. (1996), Probe-surface interaction in near-field optical microscopy: The nonlinear bending force model, Appl. Phys. Lett. 68(3), 307-309.

Hamamatsu, Technical Information, 1996.

Hecht B., Bielefeldt H., Inoué Y., Pohl D.W., Novotny L. (1997), Facts and artifacts in near-field optical microscopy, J. Appl. Phys. 81(6), 2462-2498.

Hecht B., Pohl D.W., Heinzlmann H., Novotny L. (1995), "Tunnel" near-field optical microscopy, TNOM-2, in: Photons and local probes, O. Marti and R. Möller, 93-107.

Herminghaus S., Fery A., Reim D. (1997), Imaging of droplets of aqueous solutions by tapping-mode scanning force microscopy, Ultramicroscopy 69, 211-217.

Isaacson M., Cline J., Barshatzky H (1992), Near-field optical microscopy, in: Scanning Probe Microscopy, H.K. Wickramasinghe, American Institute of Physics, Santa Barbara, USA. 23-35.

Jackson, J. D. (1975), Classical Electrodynamics, Wiley, New York, USA.

Kamath Y., Bradford I., Hornby S., ramapasad K., ruetsch S., Weigmann H.D. (1995), Analysis and quantification of hair damage, Progress Report No.9 TRI Princeton, 20-31.

Karrai K., Grober R. (1995), Piezoelectric tip-sample distance control for near-field optical microscopes, Appl. Phys. Lett. 66(14), 1842-1844.

Kassenbeck P. (1991). The hair and its structure, Wella AG, Darmstadt.

Kindl G., Raab W. (1988), Licht und Haut, Grovi-Verlag, Frankfurt, Deutschland.

Landmann L. (1985), Permeabilitätsbarriere der Epidermis, Grosse, Berlin.

Landmann L. (1986), Epidermal permeability barrier: Transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane fusion process, a freeze fracture study, J. Invest. dermatol. 87, 202-209.

Landmann L. (1991), Die Permeabilitätsbarriere der Haut, Pharmazie in unserer Zeit 4, 155-163.

Leica, Manual, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 1999.

Leigh I.M., Lane B.E., Watt F.M. (1994), The keratinocyte handbook, Cambridge Press, Cambridge.

Leszek J. W., Albrecht L. (1987), Chemical- and photobleaching of brown and red hair, J. Soc. Cosmet. Chem. 82, 179-191.

Lewis A., Isaacson M., Harootunian A., Muray A. (1984), Development of a 500 Å resolution light microscope, Ultramicroscopy 13, 227-232.

Marti O., Colchero J. (1995), Scanning probe microscopy instrumentation, in: Forces in scanning probe methods, H.J. Güntherodt, Kluwer Academic Publishers, Niederlande 1-20.

Martin O.J.F. (1999), 3D simulations of the experimental signal measured in near-field optical microscopy, Journal of microscopy 194Pt 2/3, 235-239.

Meyer E., Heinzelmann H. (1992), Scanning force microscopy, in: Scanning Tunneling Microscopy II, Wiesendanger R., Güntherodt H.J., Springer-Verlag, Berlin, Deutschland.

Mihalcea C., Scholz W., Werner S., Münster S., Oesterschulze E., Kassing R. (1996), Multipurpose sensor tips for scanning near-field microscopy, *Appl. Phys. Lett.* 68(25), 3531-3533.

Moers M.H.P., van Hulst N.F., Ruiter A.G.T., Bölger B. (1995), Optical contrast in near-field techniques, *Ultramicroscopy* 57, 298-302.

Monobe S., Saiki T., Suzuki T. Koshihara S., Ohtsu M. (1998), Fabrication of a triple tapered probe for near-field optical spectroscopy in UV region based on selective etching of a multistep index fiber, *Optics Communications* 146, 45-48.

Negri A, Rankin D.R., Nelson W.G., Rivett D.E. (1996), A transmission electron study of covalently bound fatty acids in the cell membranes of wool fibers, *Textile Res. J.* 66, 491-495.

Nishikawa S., Isu T. (1999), Photoluminescence imaging of phosphor particles using near-field optical microscope with UV light excitation, *J. of Microscopy* 194 Pt 2/3, 415-420.

Novotny L. (1996), Light propagation and light confinement in near-field optics, Dissertation, Swiss federal Institute of Technology Zurich, Schweiz.

Novotny L., Pohl D. W., Regli P. (1994), Light propagation through nanometer- sized structures, the two dimensional aperture scanning near-field optical microscope, *J. Opt. Soc. Am. A* 11(6), 1768- 1779.

Novotny L., Pohl D.W. (1995), Light propagation in scanning near-field optical microscopy, *Photons and local probes*, O. Marti and R. Möller, Kluwer Academic Publishers, Niederlande 21-33.

Pawley J.B. (1995), *Handbook of biological confocal microscopy*, Plenum Press, New York, USA.

Pedarnig J. D., Göttlich H., Heckel W.M. (1998), Calibration and set-up of 100kHz shear force distance control for near-field optical microscopy, *Probe Microscopy* 1, 239-246.

Pflücker F. (1998), Dermale Absorption von Zimtsäurederivaten und mikronisiertem Titandioxid an exzidiertter Haut, Dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie.

Pohl D. W. (1988), Near- field optical scanning microscopy (NFOS), in: *Scanning microscopy technologies and applications SPIE 897*, 83-90.

Pohl D. W., Denk W., Lanz M. (1984), Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda / 60$, *Appl. Phys. Lett.* 44(7), 651-653.

Quate, C.F. (1994), The AFM as a tool for surface imaging, *Surface Science* 299/300, 980-995.

Radmacher M., Tillmann R.W., Fritz M., Gaup H. E. (1992), From molecules to cells, Imaging soft samples with the Atomic Force Microscope, *Science* 257, 1900-1905.

Robbins C.R. (1994), *Chemical and physical behavior of human hair*, Springer-Verlag.

Robenek H. (1995), *Mikroskopie in Forschung und Praxis*, GIT Verlag, Darmstadt, Deutschland.

Rosa A., Weilandt E., Hild S., Marti O. (1997), The simultaneous measurements of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy, Pulsed force mode operation, *Meas. Sci. Technol.* 8, 1-6.

Ruiter A.G.T., van der Werf K.O., Veerman J.A., Garcia-Parajo M.F., Rensen W.H.J., van Hulst N.F. (1998), Tuning fork shear force feedback, *Ultramicroscopy* 71, 149-157.

Schaefer H., Redelmeier T.E. (1996), Skin barrier, Karger, Basel(Schweiz), 26-27.

Schueller R., Romanowski P. (1999), Conditioning agents for hair and skin, Macel Dekker, New York.

Schwan-Jonczyk A. (1999), Das Haar und seine Struktur, Wella AG, Darmstadt.

Shotton D.M. (1989), Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens, J. Cell Science, 94, 175-206.

Smolyaninov I.I., Mazzoni D.L., Davis C. C. (1995), Near-field direct-write ultraviolet lithography and shear force microscopic studies of the lithographic process, Appl. Phys. Lett. 67(26), 3859-3861.

Swartzendruber D.C., Wertz P.W., Madison K.C., Downing D.T. (1987), Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope, J. Invest. Dermatol. 88, 709-713.

Synge E.H. (1928), Phil. Mag. 56,356.

Toledo-Crow R., Chen P.C., Vaez-Iravani M. (1992), Near- field differential scanning optical microscope with atomic force regulation, Appl. Phys. Lett. 60(24), 2957-2959.

Valaskovic G.A., Holton M., Morrison G.H. (1995), Parameter control, characterization, and optimization in the fabrication of optical fiber near-field probes, Applied optics 34(7), 1215-1228.

Valle P.J., Carminati R., Greffet J.-J. (1998), Contrast mechanisms in illumination-mode SNOM, Ultramicroscopy 71, 39-48.

Wertz P.W., Swartzendruber D.C., Kitko D.J., Madison K.C., Downing D.T. (1989), The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum, J. Invest. dermatol. 93, 169-172.

Whangbo M.H., Magonov S. N., Bengel H. (1997), Tip-sample interactions and surface stiffness in scanning probe microscopy, *Probe Microscopy* 1, 23-42.

Wiesendanger R. (1994), *Scanning probe microscopy and spectroscopy*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Winkler R.G., Spatz J.P., Sheiko S., Möller M., Reineker P., Marti O. (1996), Imaging material properties by resonant tapping-force microscopy, A model investigation, *Physical Review B* 54, 8908-8912.

Wolfram L.J., Albrecht L. (1987), Chemical- and photo- bleaching of brown and red hair, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 82, 179-191.

Wortmann F.J., Wortmann G., Zahn H.(1997), Pathways for dye diffusion in wool fibers, *Textile Research Journal* 67 (10), 720-724.

Zahn, H (1984), *Feinbau und Chemie des Haares*, *Parfümerie und Kosmetik* 63, 507-590.

Zahn, H., Wortmann F.J., Höcker H. (1997), *Chemie und Aufbau der Wolle*, *Chemie in unserer Zeit* 6, 280-290.

Zeisel D., Deckert V., Zenobi R., Vo-Dinh T. (1997), Near-field surface enhanced raman spectroscopy of dye molecules adsorbed on silver island films, *Chem. Phys. Lett.* 283, 381-385.

Zviak C. (1986), *The science of hair care*, Marcel Dekker, New York.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Wiesendanger und Herrn Dr. U. Hintze möchte ich danken, daß die vorliegende Arbeit im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Angewandte Physik und der Firma Beiersdorf AG durchgeführt werden konnte.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Will und Herrn Dr. R. Wepf für die gute Betreuung und Zusammenarbeit in der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG.

Ein Dank geht nach Ulm zu Herrn Dr. O. Hollricher und der Firma Witec GmbH für die Beratung und Hilfe bei der Umgestaltung des instrumentellen Aufbaus.

Für die Hilfestellung bei der Präparation von Haut und der Ultramikrotomie möchte ich Herrn S. Pfeiffer und Frau Dr. G. Vielhaber danken.

Frau Dr. S. Wessel danke ich für die Überlassung einiger CLSM-Messungen und die Einweisung in diese Mikroskopietechnik.

Für die vielen interessanten Gespräche innerhalb und außerhalb des Firmenalltags und für das angenehme Betriebsklima möchte ich mich weiterhin bei Herrn S. Wiesner, Herrn E. Gärtner, Herrn Dr. F. Pflücker, Herrn A. Döring, Frau Dr. S. Wessel und Herrn T. Mehm herzlich bedanken.

Ausdrücklich möchte ich meiner liebevollen und meist nachsichtigen Lebensgefährtin Andrea Frahm für den moralischen Beistand während der letzten 3 Jahre danken.

Für die tatkräftige Unterstützung während des gesamten Studiums möchte ich mich auf diesem Wege bei meinen Eltern Friedrich Adolf und Ingrid Kelch bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Alexander Kelch
Schmidtweg 8a
21029 Hamburg

geb. am 3.4.1970 in Reinbek,
ledig

Schulbildung:

8/1976 – 6/1980 Grundschule in Glinde-Wiesenfeld

8/1980 – 5/1989 Gymnasium in Glindemitt
Abschluss: Abitur

Zivildienst:

1/1990 – 3/1991 Hausmeister Tätigkeit in der Kirchengemeinde
Hamburg-Ötendorf

Studium:

4/1991 – 6/1997 Fachrichtung Physik mit Abschluss: Diplom;
externe Diplomarbeit in der Analytischen Forschung
der Firma Beiersdorf AG in Hamburg von 6/1996 – 6/1997 mit dem Thema
„Untersuchungen zur Mikrostruktur des Haars und Nachweis von
Produktivierung mittels Rasterkraftmikroskopie“

Promotion:

7/1997 –
7/2000 Externe Arbeiten zur Promotion in der Analytischen
Forschung der Firma Beiersdorf AG in Hamburg mit dem Thema
„Nahfeldoptische Untersuchungen an biologischen Systemen im
ultravioletten und sichtbaren Wellenlängenbereich“